



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



Nanočástice hydroxyapatitu a jejich příprava

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály
Autor práce: **Marek Čihák**
Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Marek Čihák**
Supervisor: Ing. Miroslava Rysová



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marek Čihák**
Osobní číslo: **M13000149**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Nanočástice hydroxyapatitu a jejich příprava**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu a vypracujte rešerši týkající se vlastností a možností přípravy hydroxyapatitu a jeho nanočástic.
2. Na základě prostudované teorie zvolte alespoň jednu metodu přípravy a v laboratorních podmínkách ji ověřte.
3. Vyšetřete vliv parametrů přípravy na průběh procesu a vlastnosti připravených nanočástic.
4. Výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **cca 40 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] Fzel-Rezai, R. ed., 2011. Biomedical Engineering Frontieres and Challenges. InTech, Rijeka. ISBN 978-953-307-309-5
- [2] Brown, P. W. and Constantz, B., eds, 1994. Hydroxyapatite and related materials. CRC Press, Inc., Boca Raton. ISBN 0-8493-4750-5
- [3] Sadat-Shojai, M. et al., 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta Biomaterialia 9 (2013), pp. 7591-7621
- [4] Mostafa, N. Y., 2005. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. Materials Chemistry and Physics 94 (2005), pp. 333-341
- [5] Sanosh, K. P. et al. 2009. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. Bulletin of Materials Science 32 (5), pp. 465-470
- [6] Brinker, C. J. and Scherer, G. W., eds., 1990. Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. Academic Press, Inc., London. ISBN-13: 978-0-12-134970-7

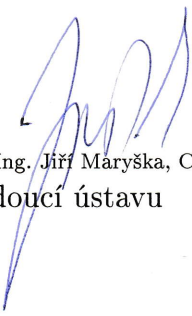
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Miroslava Rysová**

Datum zadání bakalářské práce: **20. října 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2016**


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2015

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.


Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 16. května 2016

Podpis: 

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Martinu Stuchlíkovi, Ing. Janu Grégrovi a Jiřímu Junkovi za pomoc a rady při řešení problémů souvisejících s výpočty a postupy v experimentální části, také Ing. Janě Müllerové, Ph.D. za pomoc při analýze nanočástic na Ramanově spektrometru a Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D. za snímky a analýzu na rastrovacím elektronovém mikroskopu. Hlavní poděkování patří Ing. Miroslavě Rysové za vedení, odborné rady a připomínky při psaní bakalářské práce a ochotu při provádění experimentů.

Velké poděkování patří také mým rodičům, přátelům a celé rodině za velkou podporu jak při studiu, tak při psaní bakalářské práce.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá nanočásticemi hydroxyapatitu (HAP), konkrétně jejich přípravou a následnou charakterizací. Teoretická část práce popisuje, jakými metodami je možné hydroxyapatit a jeho nanočástice připravit. Cílem experimentální práce bylo jednu z metod popsaných v teoretické části zvolit a prozkoumat možnosti přípravy nanočástic HAP touto metodou. V této práci byla zvolena metoda precipitační. U ní byl prověřen hlavně vliv procesních parametrů na finální vlastnosti částic, resp. nanočástic, a jak je možné docílit předem určeného složení, struktury a velikosti produktu. Mezi podmínky, které nejvíce ovlivňují tvorbu hydroxyapatitu, patří teplota, pH, koncentrace výchozích látek, správný molární poměr vápníku k fosforu v reaktantech a také doba stárnutí suspenze. Vzniklé nanočástice byly analyzovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu s jednotkou EDS, Ramanova spektrometru a dynamického rozptylu světla. U vybraného vzorku byla ověřena také biokompatibilita.

Klíčová slova

Hydroxyapatit, nanočástice, metody přípravy hydroxyapatitu, precipitační metoda

ABSTRACT

This work is focused on hydroxyapatite (HAP) nanoparticles, especially on their synthesis and characterization. Theoretical part of this thesis is focused on review of preparation methods for HAP and HAP nanoparticles synthesis. The aim of this work was to choose and analyze one of these methods. In this work, the precipitation method was chosen. The mostly investigated factors were those affecting the final particle size and properties, and how the predetermined composition, structure and particle size can be achieved. The conditions mostly affecting the hydroxyapatite synthesis include temperature, pH, concentration of precursors, correct molar ratio between calcium and phosphorus and also time of solution aging. Formed particles were analysed using scanning electron microscope with electron-dispersive X-ray spectroscopy, Raman spectrometer and Dynamic Light Scattering analysis. One chosen sample was tested on biocompatibility level.

Keywords:

Hydroxyapatite, nanoparticles, preparation methodologies, precipitation method

OBSAH

1	Teoretická část	15
1.1	Hydroxyapatit	15
1.1.1	Vlastnosti	15
1.1.2	Aplikace	16
1.2	Metody přípravy hydroxyapatitu	16
1.2.1	Mokrý metody	16
1.2.1.1	Metoda precipitační	17
1.2.1.2	Metoda sol-gel	18
1.2.1.3	Hydrotermální metoda	18
1.2.2	Suché metody	19
1.3	Metody analýzy částic hydroxyapatitu	19
1.3.1	Rastrovací elektronová mikroskopie	19
1.3.2	Ramanova spektroskopie	20
1.3.3	Rentgenová fluorescenční spektroskopie	20
1.3.4	Dynamický rozptyl světla	21
1.4	Možnosti přípravy nanočástic hydroxyapatitu	22
2	Experimentální část	36
2.1	Cíle experimentální části	36
2.2	Syntéza nanočástic	36
2.2.1	Použité chemikálie	36
2.2.2	Použitá metoda	37
2.2.3	Postup syntézy	38
2.3	Analýza částic	41
2.3.1	Analýza velikosti částic v suspenzi – DLS	41
2.3.1.1	Příprava vzorků a měření	41
2.3.1.2	Výsledky a diskuze	41

2.3.2	Analýza velikosti a tvaru nanočástic – SEM	43
2.3.2.1	Příprava vzorků a měření	43
2.3.2.2	Výsledky a diskuze	43
2.3.3	Chemické složení – EDS	46
2.3.3.1	Příprava vzorků a měření	46
2.3.3.2	Výsledky a diskuze	46
2.3.4	Analýza chemického složení – Ramanova spektrometrie	47
2.3.4.1	Příprava vzorků a měření	47
2.3.4.2	Výsledky a diskuze	48
2.3.5	Ověření biokompatibility – MTT	50
2.3.5.1	Příprava vzorků a měření	50
2.3.5.2	Výsledky a diskuze	51
3	Závěr	52
	Použitá literatura	54

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Analýza částic z práce Paz a kol. [18].....	17
Obrázek 2. Vlivy reakčních faktorů z práce Sadat-Shojai a kol. [7]	18
Obrázek 3. Graf zobrazující Stokesův posuv. [19].....	20
Obrázek 4. Snímek z FESEM z práce Saeri a kol. [12].....	24
Obrázek 5. Analýza částic vytvořených Mostafa a kol. [15].....	26
Obrázek 6. Snímky ze SEM z práce Vázquez a kol. [16].....	27
Obrázek 7. XRD spektrum HAP z práce Yoruç a kol. [20].....	30
Obrázek 8. Graf rentgenové difrakce (Angelescu a kol.). [22].....	31
Obrázek 9. Snímek HAP z práce Castro a kol. [23]	32
Obrázek 10. Snímek z TEM, HAP vytvořené v práci Chandrasekar a kol. [24].....	33
Obrázek 11. Distribuce velikosti částic HAP z práce Chandrasekar a kol. [24]	33
Obrázek 12. Časové vývoje produktu z práce Zyman a kol. [25]	34
Obrázek 13. Schéma použité aparatury.	38
Obrázek 14. Schéma použité při přípravě nanočástic hydroxyapatitu.....	39
Obrázek 15. Histogram distribuce velikostí částic.	42
Obrázek 16. Spektrum EXP6 z EDS analýzy.	47
Obrázek 17. Srovnání viability buněk.	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Vybrané přípravy nanočástic hydroxyapatitu.	23
Tabulka 2. Souhrn výsledků analýzy částic HAP připravených v práci Monmaturpoj z roku 2008. [21].....	29
Tabulka 3. Podmínky precipitačních reakcí při práci Angelescu a kol. [22].....	31
Tabulka 4. Rozdělení experimentů podle podmínek reakce.	37
Tabulka 5. Provedení experimentů.	40
Tabulka 6. Distribuce velikosti částic časových odběrů při experimentu číslo 2.	42
Tabulka 7. Snímky vzorků z elektronového mikroskopu.	44
Tabulka 8. Výsledky energiově-disperzní analýzy.	47
Tabulka 9. Nastavení měření na Ramanově spektroskopu.	48
Tabulka 10. Spektra z Ramanova spektrometru.	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina octová
CNT	tetrahydrát dusičnanu vápenatého
DCP	fosforečnan vápenatý
DLS	dynamický rozptyl světla (Dynamic light scattering)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EDS	energieově-disperzní spektroskopie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HAP	hydroxyapatit
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NHP	hydrogenfosforečnan diamonný
OCP	oktakalcium fosfát
-OH	hydroxylová skupina
PEG	polyethylenglykol
FESEM	field emission scanning electron microscopy
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
XRF	rentgenová-fluorescenční spektroskopie
β-TCP	romboedrální fosforečnan vápenatý

ÚVOD

Již několik desítek let se vědecké týmy věnují přípravě hydroxyapatitu s požadovanými vlastnostmi, morfologií a strukturou. Velká pozornost je věnována hlavně nanočásticím hydroxyapatitu podobným těm, které jsou obsažené v kostním matrixu. Důvodem jsou především jejich specifické vlastnosti a široké využití v medicíně. Důležitá je v tomto ohledu hlavně biokompatibilita nanočástic, která je zajištěna také správným molárním poměrem vápníku k fosforu, a to cca. 1,67. Během dlouhých let výzkumu se pro přípravu takových nanočástic nejvíce osvědčily metody precipitační, sol-gel a hydrotermální. Ovšem metoda sol-gel je pro přípravu poněkud finančně náročnější, hlavně kvůli dostupnosti reaktantů, proto je většinou volena metoda precipitační.

Pro charakterizaci syntetizovaných částic hydroxyapatitu je možno zvolit mezi mnoha metodami v závislosti na tom, zda potřebujeme analyzovat složení, velikost, strukturu, morfologii nebo biokompatibilitu. Pro velikost částic je nejčastěji používána disperzní analýza, ovšem u té nebývá dosaženo takové přesnosti v důsledku aglomerace částic do klastrů, nebo elektronová mikroskopie, která je používána i k analýze struktury. Důležité je při analýze určit chemické složení produktu, to je většinou zařizováno pomocí Ramanovy spektrometrie, energiově-disperzní spektrometrie, která je zároveň použita k určení molárního poměru Ca/P. Další možností analýzy je použití rentgenové fluorescenční spektrometrie (XRF).

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 HYDROXYAPATIT

Hydroxyapatit je přirozeně se vyskytující minerál, který má hned několik zbarvení, a to žluté, hnědé nebo i zelené, ovšem ve formě prášku má bílou barvu. Patří mezi skupinu vápenatých fosforečnanů, resp. apatitů, vyskytujících se v přírodě s podobnou strukturou (hexagonální) avšak s různými složkami ve struktuře, jako například fluor, chlor nebo voda, navázanými kovalentními vazbami. Zdrojů hydroxyapatitu je hned několik, patří mezi ně například lidské kosti, kosti skotu, rybí kosti, korály, skořápky vajec a další. Ovšem takto získaný hydroxyapatit s sebou může nést potenciální zdravotní rizika a při aplikaci v medicíně může být zdrojem infekce a příčinou onemocnění, proto se hojněji používá hydroxyapatit syntetizovaný. Souhrnný vzorec hydroxyapatitu je $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, ovšem jeho krystalovou jednotku tvoří dvě molekuly, proto se jako vzorec uvádí $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ze vzorce je vidět, že syntetizovaný hydroxyapatit má molární poměr Ca/P přibližně 1,67. Poměr Ca/P může být při výrobě i jiný, ovšem takto připravený HAP není natolik podobný hydroxyapatitu přirozeně se vyskytujícímu v lidských kostech. Odchytky v molárním poměru vedou ke změnám struktury i vlastností, což může být v případě medicínských aplikací nežádoucí.

1.1.1 Vlastnosti

Jednou z nejdůležitějších vlastností hydroxyapatitu, syntetizovaného v molárním poměru $\text{Ca/P} = 1,67$, je jeho výborná biokompatibilita. Jedná se o schopnost začlenění materiálu do biologického prostředí (organismu), tedy materiál nesmí být toxický, nesmí narušovat reakce v organismu, například koagulaci, také by neměl způsobovat žádné infekční procesy. Co se týče bioaktivity nebo bioafinity, ukázal se HAP jako ideální materiál pro své aplikace (viz 1.2.3). Osteokondukce je další zajímavou vlastností HAP, dochází k růstu, resp. spojení kosti s implantátem. S tímto jevem souvisí také osteoindukce, která zajišťuje podporu kostního štěpu při hojení nebo regeneraci. Vlastnosti jako je struktura částic, velikost, stupeň krystalinity, ale také mechanické

vlastnosti závisí silně na metodě přípravy a jejích podmínkách. HAP, nacházející se v kostech, se velikostí částic pohybuje v řádech nanometrů.

1.1.2 Aplikace

Jak již bylo zmíněno, hydroxyapatit ve formě nanočástic se hojně využívá hlavně v medicíně. Nejvíce se jedná o náhrady kostní nebo zubní tkáně ve formě augmentačních materiálů a implantátů, využívá se také k povlakování dentálních implantátů nebo také jako znecitlivující látka při bělení zubů či mineralizující složka zubní pasty. Povlakování HAP se provádí hlavně u titanových nebo ocelových implantátů za účelem snížení míry odmítnutí implantátu tělem. Nanočástice hydroxyapatitu jsou hlavní složkou smaltu v zubním lékařství, proto se jeví zuby zářivě bílé a mají sníženou reflektivitu světla, důvodem jsou zmenšené póry na povrchu smaltu. Nanočástice HAP jsou pro medicínské aplikace výhodnější než částice větší, jelikož lépe densifikují k větším povrchům a v důsledku mají větší tvrdost a lepší mechanické vlastnosti. Mezi další využití nanočástic HAP patří také transport léčiv.

Mimo medicínské využití se také přidává hydroxyapatit do nanostrukturovaných vzduchových filtrů, čímž se docílí absorpce oxidu uhelnatého z výfukových plynů. Další použití může být jako katalyzátor Michaelovy adice, oxidace methanu nebo jako fluorescein, iontový konduktor, plynový senzor, ale také jako činidlo při chromatografii proteinů a nukleových kyselin.

1.2 METODY PŘÍPRAVY HYDROXYAPATITU

1.2.1 Mokrý metody

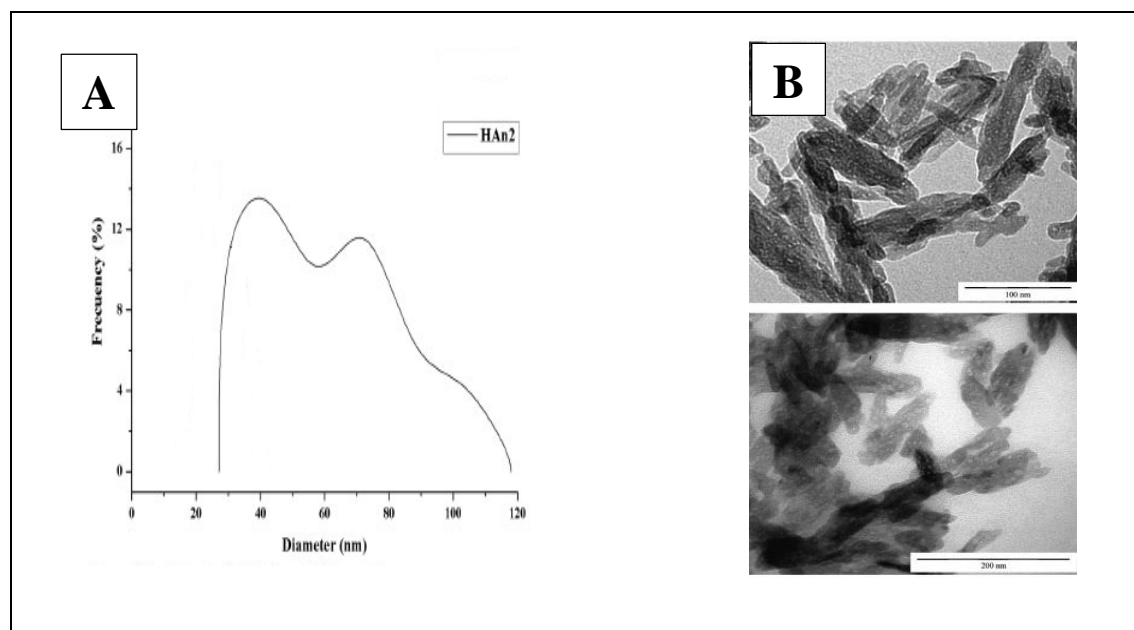
Mokrý metody se nejčastěji používají k přípravě nanočástic. Výhodou těchto metod je možnost kontrolovat morfologii a velikost vznikajících částic, resp. nanočástic. To se uskutečňuje změnou reakčních podmínek, jako je teplota, pH, koncentrace výchozích látek, doba stárnutí, teplota sušení. Ovšem jednou z nevýhod je nižší teplota reakcí v porovnání se suchými metodami, což způsobuje přítomnost jiných sloučenin než jen hydroxyapatitu. Mokřým procesem je také snížena krystalinita produktu.

Přípravy založené na roztocích, v organickém rozpouštědle nebo ve vodě, mohou být uskutečněny několika technickými cestami zahrnující různé chemické příměsi nebo

použité aparatury. Velkým problémem u mokrých metod je znečištění produktu během syntézy, často se jedná o různé soli způsobené příměsemi měnící pH roztoku (NaOH, NH_4OH ,...). To se nejčastěji řeší stáčením na centrifuze a následným několikanásobným promýváním původním rozpouštědlem. [27]

1.2.1.1 Metoda precipitační

Nejjednodušší metodou přípravy nanočástic hydroxyapatitu je metoda precipitační. Principem metody je pomalé přikapávání jednoho reagentu k druhému, čímž vznikne finální produkt. Nejvhodnějším rozpouštědlem pro tuto metodu je voda nebo ethanol, ovšem v ethanolu vznikají částice větší velikosti. Precipitace se provádí za různých podmínek, počínaje laboratorní teplotou a kyselým pH, až po teplotu blížící se bodu varu rozpouštědla a zásadité pH. Po precipitaci následují další možné úpravy produktu, jako například stárnutí, což má velký vliv na finální podíl hydroxyapatitu v produktu a velikost částic. Tedy čím je delší doba stárnutí, tím více částice aglomerují, ale tím se také mění poměr množství různých sloučenin ve finálním produktu včetně hydroxyapatitu. Produkt se ve finále promyje, aby se zbavil nežádoucích iontů, filtruje a suší, popřípadě vypaluje. Při vyšší teplotě a silně zásaditém pH reakce vzniká vysoce čistý produkt. Mohou se také použít různá chelatační, stopovací či disperzní činidla, která kontrolují morfologii a velikost částic. Mezi taková činidla patří například PEG, PEG-OH, močovina, EDTA a další. [27]



Obrázek 1. Analýza části z práce Paz a kol. [18] (A) Distribuce velikosti částic hydroxyapatitu připraveného precipitační metodou. (B) Snímek z TEM zobrazující velikost částic hydroxyapatitu připraveného precipitační metodou.

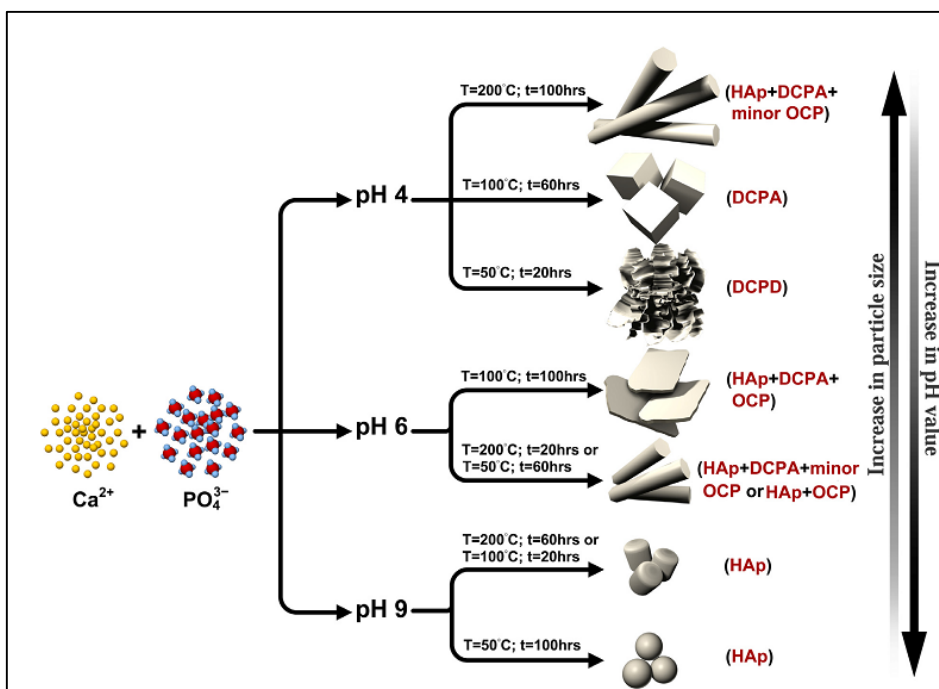
1.2.1.2 Metoda sol-gel

Jednou z mokrých metod přípravy hydroxyapatitu je metoda sol-gel. Ta umožňuje míchání reaktantů na molekulové úrovni, čímž zlepšuje chemickou homogenitu, a to za teplot nižších než 1000°C. Metoda sol-gel využívá hlavně prekurzorů patřící pod alkoxidy.

V prvním kroku této metody se připraví roztoky prekurzorů, které se následně nechají vyvíjet, aby vytvořily sol. Poté dochází ke gelaci, která většinou probíhá za vyšších teplot za současného vypařování rozpouštědla. Posledním krokem je pak sušení nebo kalcinace produktu. Nevýhody metody sol-gel jsou hlavně vysoká cena prekurzorů, časová náročnost a častý výskyt sekundárních fází. [27]

1.2.1.3 Hydrotermální metoda

Hydrotermální metoda přípravy hydroxyapatitu je velice podobná metodě precipitační. Rozdílem je zde průběh vyvíjení produktu za vysoké teploty a tlaku. Touto metodou se vytváří vysoce krystalické částice HAP s vysokou čistotou. Na Obr. 2 je ukázán vliv reakčních podmínek (pH, teplota, doba vyvíjení) na strukturu produktu, velikost částic a přítomnost dalších fází. [27]



Obrázek 2. Vlivy reakčních faktorů na morfologii, velikost částic a přítomnost fází z práce Sadat-Shojai a kol. [7]

1.2.2 Suché metody

Suché metody jsou pro výrobu hydroxyapatitu nejvíce využívané v průmyslu. Jak již název vypovídá, nepoužívají se zde žádná rozpouštědla. U suchých metod se nemusí dbát na kontrolu podmínek přípravy jako u metod mokrých, jelikož je vliv těchto podmínek zanedbatelný, ovšem při těchto metodách je většinou dosaženo částic o velikosti v řádech mikrometrů. Mezi suché metody se řadí metoda pevného skupenství a metoda mechano-chemická. [27]

1.3 METODY ANALÝZY ČÁSTIC HYDROXYAPATITU

1.3.1 Rastrovací elektronová mikroskopie

Tato metoda analýzy částic a elektronová mikroskopie všeobecně je založena na interakci elektronů primárního svazku s povrchem pevné látky. Pro zobrazování se využívá odražených elektronů, například sekundárních elektronů, zpětně odražených primárních elektronů nebo fotonů rentgenového záření.

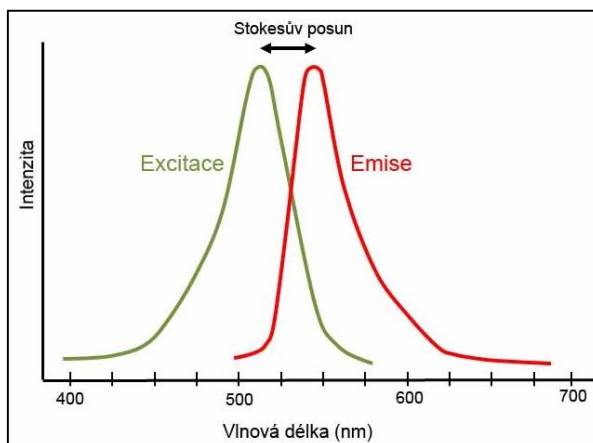
Vznik obrazu je u rastrovacího elektronového mikroskopu zprostředkován změnou interakce v bodě vzorku, která vede ke změně intenzity signálu z detektoru a ke vzniku kontrastu na zobrazovacím zařízení. Pro sekundární elektrony musí být vzorek vodivý, k čemuž dochází při případném pokovení platinou nebo zlatem.

Rastrovací elektronová mikroskopie je využívána hlavně při měření velikosti vytvořených částic, resp. nanočástic. [1]

Elektronové mikroskopy je možné také rozšířit o jednotku energiově-disperzní spektroskopie, tzv. jednotku EDS. Tato metoda se používá k prvkové analýze studovaných materiálů. EDS využívá vyražených elektronů z vnitřních slupek atomu, které se tak dostávají do excitovaného stavu a při následné deexcitaci je vyzářeno kvantum elektromagnetického záření. Z intenzity těchto vyzářených fotonů je možné získat prvkové složení a také kvantitativní analýzu.

1.3.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda založená na neelastickém rozptylu při průchodu monochromatického záření zkoumanou látkou, tzv. Ramanově rozptylu, kdy dochází k předání energie vibračním a rotačním stavům atomů a molekul. Jako výstup je zde získán soubor posunutých vlnových délek (Stokesův posuv¹), viz Obr. 3, který je převeden na graf (spektrum) závislosti intenzity rozptýleného záření na vlnové délce (resp. Ramanově posunu v cm^{-1}).



Obrázek 3. Graf zobrazující Stokesův posuv. [19]

Tato metoda se široce využívá pro zjištění chemického složení plyných, kapalných i pevných látek.

Protože se této metody hojně využívá ve spojení s optickým mikroskopem, je možné analyzovat i vzorky velmi malých rozměrů. V některých případech i pod 1 mikron – musí být zobrazitelný běžným optickým mikroskopem. Nicméně intenzita spektra je závislá na konkrétní struktuře vzorku. [2, 6]

1.3.3 Rentgenová fluorescenční spektroskopie

Metoda XRF využívá interakce vysokoenergetického rentgenového záření s látkou. Při dopadu záření může dojít k vyražení elektronů v látce a následnému zaplnění vakance elektrony z vyšší energetické hladiny. Tento přechod doprovází vyzáření energie ve formě fotonů a vznik série spektrálních čar. Pořadí čar ve spektru odpovídá změně hlavního kvantového čísla a určuje chemické prvkové složení látky (kvalitativní analýza). Polohu čar můžeme v závislosti na atomovém čísle prvku vyjádřit pomocí Moseleyova zákona (1):

$$\vartheta = k(Z - 1)^2 \quad (1)$$

¹ Při dopadu fotonu na pevnou látku dochází k jeho absorbování a následnému přechodu do excitovaného stavu. Jedním ze způsobů návratu systému do základního stavu je vyzáření fotonu, tedy dojde ke ztrátě energie. Stokesův posuv nastává v případě, že se energie absorbovaného fotonu liší od energie fotonu emitovaného látkou. [6]

kde k je konstantní pro danou čáru ve spektru. Intenzita čar ve spektru nám určuje množství atomů daného prvku, tedy jeho koncentraci (kvantitativní analýza). Hlavní výhodou XRF je nedestruktivnost vzorků, proto je metoda univerzální v možných oblastech využití. Důležitým faktorem u této metody je rentgenový fluorescenční výtěžek, značící se ω_q , viz (2), který pro sérii q udává počet zářivých přechodů n_z z celkového počtu vakancí n_q .

$$\omega_q = \frac{n_z}{n_q} \quad (2)$$

Ze vzorce je vidět, že citlivost metody roste s rostoucím atomovým číslem Z . [2, 3]

1.3.4 Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla, nebo také fotonová korelační spektroskopie, je založena na vzájemném vztahu Brownova pohybu² s velikostí částic. Princip metody spočívá v osvětlení koloidního roztoku laserem o určité vlnové délce a zaznamenávání intenzity rozptýleného světla. V důsledku rychlejšího pohybu malých částic oproti částicím velkým může být vztah velikosti a rychlosti částic definován Stokesovou-Einsteinovou rovnicí. Ovšem jedná se o tzv. hydrodynamický průměr velikosti částic, což je průměr kulové částice, která by měla stejný difúzní koeficient jako částice měřená v systému. [34]

ZetaSizer je koloidní analyzátor umožňující měřit hned několik parametrů částic v roztoku. Mezi tyto parametry patří velikost částic, molekulová hmotnost a zeta potenciál. V případě měření velikosti částice je výstup intenzitní distribucí velikosti částic v systému. Přístroj umí také ze znalosti indexu lomu částic v roztoku a jejich absorbance převést tento výstup na distribuci objemovou. Další metodou měření je statická rozptyl světla, kdy se provádí měření koncentrační série roztoků, která se postupně mění. Dochází k detekci rozptýleného světla a k určení molekulové hmotnosti ze Zimmova diagramu³. Třetí možností analýzy na ZetaSizeru je tzv. zeta potenciál. Tato vlastnost udává elektrostatickou stabilitu vzorku, tedy pokud je zeta potenciál v intervalu -30 až 30 mV,

² náhodný pohyb částic rozptýlených v kapalném nebo plynném prostředí

³ Zimmův diagram graficky znázorňuje závislost intenzity rozptýleného světla na koncentraci a úhlu pozorování. Vynáší se výraz $\frac{K \cdot w}{R_\theta}$, kde K je rozptylová konstanta, w hmotnostní koncentrace a R_θ je Rayleighův poměr, proti $\sin^2 \frac{\theta}{2} + k \cdot w$, kde θ je úhel pozorování a k libovolná konstanta. [5]

pak je systém nestabilní, neboť může dojít k aglomeraci částic. Ten je měřen pomocí Dopplerovy laserové velocimetrie. Na vzorek ve speciální kyvetě je přivedeno napětí a sleduje se rychlost pohybu částic k opačně nabitě elektrodě. Ze znalosti viskozity a permitivity vzorku lze, pomocí takto změřené elektroforetické mobility, určit zeta potenciál systému. [4]

1.4 MOŽNOSTI PŘÍPRAVY NANOČÁSTIC HYDROXYAPATITU

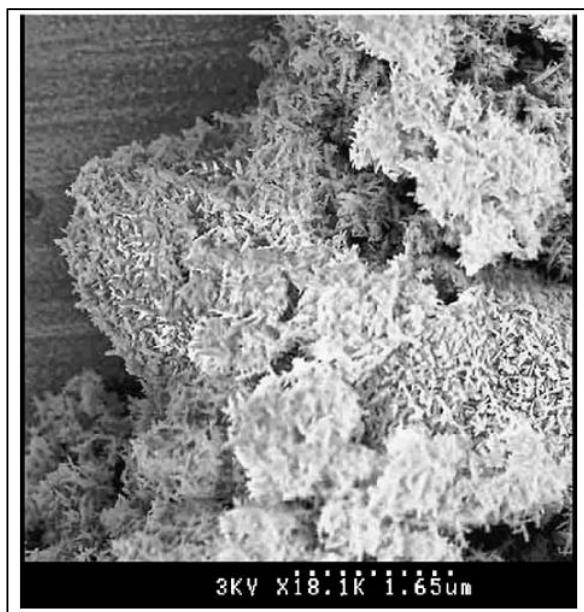
Existuje mnoho studií o přípravě HAP precipitační metodou používající různé reaktanty, různé podmínky, dosahující různých struktur a velikostí částic. Některé takové experimenty jsou shrnuty v Tabulce 1. Tato část bakalářské práce se zabývá porovnáním těchto experimentů a možností přípravy HAP podle základních faktorů ovlivňujících strukturu, velikost vzniklých částic a jejich čistotu. Mezi tyto faktory patří například koncentrace reaktantů, teplota reakce, pH, rychlost mísení reaktantů, doba stárnutí a také rychlost míchání reaktantů na míchadle. Tabulka níže (Tab. 1) shrnuje některé ze zahraničních publikací týkajících se přípravy nanočástic HAP. Výsledky jednotlivých experimentů v ní shrnutých jsou potom rozvedeny v dalším textu.

Tabulka 1. Vybrané přípravy nanočástic hydroxyapatitu, vzhledem k podmínkám přípravy, od některých zahraničních autorů.

Autor	reaktanty	Ca/P	pH	Teplota (°C)	Doba stárnutí (hod)	Velikost částic (nm)	Struktura částic	Zdroje
Saeri et al. (2003)	H ₃ PO ₄ (0,3 M) Ca(OH) ₂ (0,5 M)	1,67	7,5	40	0 a 24	200×50	jehličková	[12]
Yubao et al. (1994)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ Ca(NO ₃) ₂	1,59	10,5	Laboratorní	0	23×91	jehličková	[13]
Santos et al. (2004)	H ₃ PO ₄ (0,3 M) Ca(OH) ₂ (0,5 M)	1,67	7-11,5	40	24	---	jehličková	[14]
Mostafa (2005)	H ₃ PO ₄ (0,3 M) Ca(OH) ₂ (0,5 M)	1,7	---	100	2	141	---	[15]
Vázquez et al. (2005)	H ₃ PO ₄ (0,6 M) Ca(OH) ₂ (1 M)	1,67	---	90	---	400	---	[16]
Mobasherpour et al. (2007)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,29 M) Ca(NO ₃) ₂ (0,24 M)	1,16	11	25	0	8-50	hexagonální	[17]
Monmaturapoj (2008)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,06 M) Ca(NO ₃) ₂ (0,1 M)	1,67	11	100	24	4-26	---	[21]
Yoruç et al. (2009)	H ₃ PO ₄ Ca(OH) ₂	1,67	---	---	0	50-100	---	[20]
Angelescu et al. (2011)	H ₃ PO ₄ (0,01 35 M) Ca(OH) ₂ (0,259 M)	---	10,5	75	2 a 48	37-45	---	[22]
Castro et al. (2012)	H ₃ PO ₄ (11,5-19,3 mmol/l) Ca(OH) ₂ (19,3 mmol/l)	1: 1,33; 1,67	7	25	---	20×100	tyčinkovitá	[23]
Chandrasekar et al. (2013)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,8 M) Ca(NO ₃) ₂ (1,2 M)	1,68	10,8	---	---	50-70	---	[24]

Ve své práci z roku 2003 se Saeri a kol. [12] zabývali vlivem doby stárnutí produktu a vlivem teploty jeho zahřívání po reakci. Jako výchozí reaktanty použili roztok kyseliny fosforečné (0,3 mol/l) a hydroxidu vápenatého (0,5 mol/l). Během precipitační reakce byla teplota udržována na 40°C a pH 7,5.

Roztok kyseliny byl přikapáván rychlostí 1-2 kapky/s. První vzorek byl sejmут ihned po skončení precipitační reakce a druhý a třetí vzorek byly sejmuty po 24 hodinách. Vzorek číslo jedna byl po odebrání míchán po dobu 2 hodin při 2400 otáčkách za minutu a ke vzorku číslo 3, který byl sejmut ve stejný čas jako vzorek číslo 2, byl přidán roztok kyseliny fosforečné (1 mmol/l) a byl ponechán stárnout po dobu 24 hodin.



Obrázek 4. Snímek z FESEM, zobrazující vytvořené klastry z nanočástic hydroxyapatitu z práce Saeri a kol. [12]

Produkty byly promyty vodou a sušeny při 80°C po dobu 24 hodin. Sinterování probíhalo při teplotách 850°C a 1200°C po dobu 2 hodin. Vzniklé částice (viz Obr. 4) se velikostně pohybovaly okolo 200 nm na délku a 50 nm v průměru, jejich struktura byla jehličková. Vzorek číslo 2 měl částice narostlé do tvaru destiček. U vzorků, které byly zahřáté na 850°C a 1200°C byla mnohokrát zvýšena krystalinita, ovšem u vzorku, který byl zahřát na 850°C byla krystalinita vyšší než u vzorku zahřátého na 1200°C. [12]

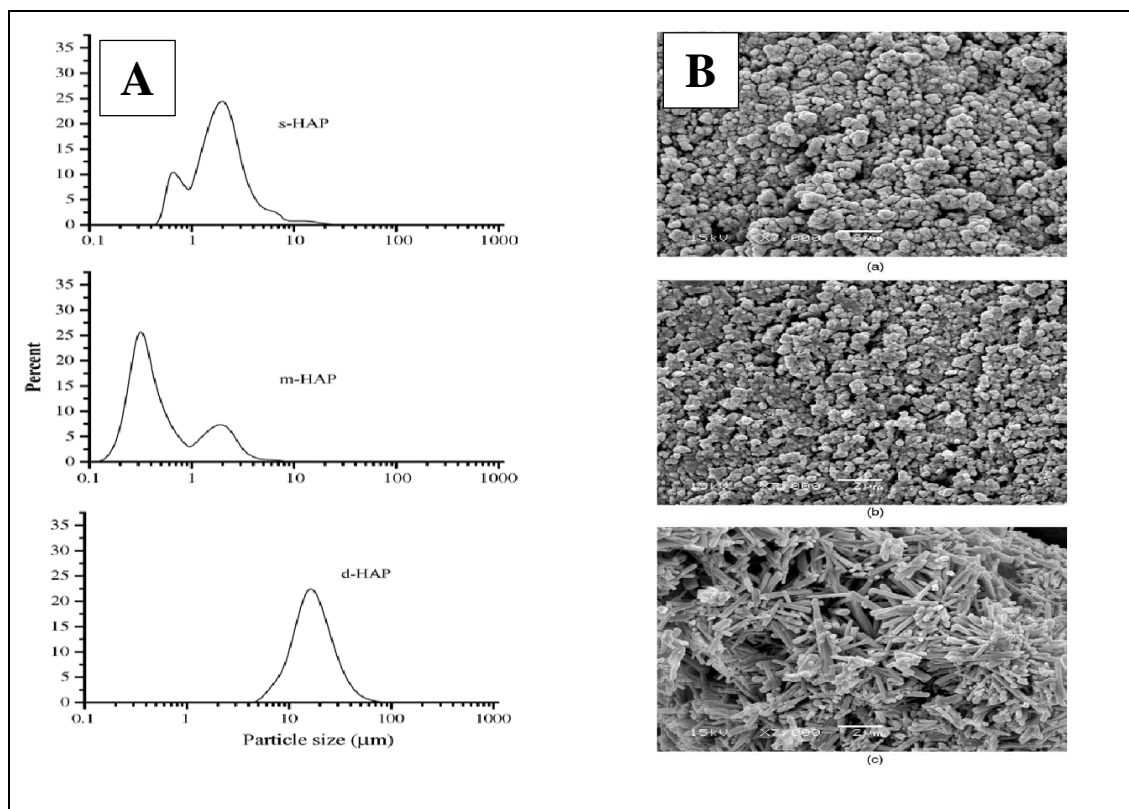
Yubao a kol. využili ve své práci [13] precipitační reakci hydrogenfosforečnanu diamonného a dusičnanu vápenatého, kdy byla hodnota pH reakce udržována v rozmezí 10 – 12 a precipitace probíhala za laboratorní teploty. Preparáty byly po reakci vloženy do autoklávy a hydrotermálně upraveny při teplotě 140°C a tlaku 0,3MPa po dobu 2 hodin. Produkt měl molární poměr Ca/P roven 1,52-1,59 a morfologie byla jehličková. Velikost částic vzniklého hydroxyapatitu byla 23×91 nm a po kalcinaci při 600°C byla velikost poměrně menší, a to 22×67 nm. [13]

V práci, kterou provedli Santos a kol. [14], bylo použito reakce hydroxidu vápenatého (0,5 mol/l) a kyseliny trihydrogenfosforečné (0,3 mol/l). Nejprve byl roztok hydroxidu zahříván na 40°C a míchán po dobu jedné hodiny a poté k němu byla rychlostí

6 ml/min přikapávána kyselina fosforečná. Úprava pH probíhala pomocí hydroxidu amonného (1 mol/l), a to na hodnoty 7 – 11,5. Takto probíhala reakce pro vzorky (1-7). Dalším způsobem bylo, pro vzorky 8 a 9, použití hydrogenfosforečnanu diamonného, který byl přikapáván k roztoku hydroxidu vápenatého (0,3 mol/l) při teplotě 40°C. Vzorky 10 – 12 byly připraveny reakcí hydroxidu vápenatého (0,3 mol/l) s monohydrátem dihydrogenfosforečnanu vápenatého (0,12 mol/l), který byl pomalu přikapáván k roztoku hydroxidu při laboratorní teplotě. Hodnota pH byla u vzorků 8 – 12 pouze kontrolována, ale neupravována. Vzniklé suspenze byly po 24 hodinách zfiltrovány a promyty deionizovanou vodou. Sušení probíhalo při teplotě 100°C po dobu 12 hodin. Při SEM analýze byla zjištěna přítomnost agregátů z částic, které měly tvar krátkých až dlouhých jehliček, úzkých destiček nebo sloupků. Přítomnost hlavně hydroxyapatitu ve vzorcích byla potvrzena při analýze XRF, stopové množství jiných prvků bylo přítomno také, ovšem spíše jako nezreagované původní sloučeniny. Krystalinita produktů sušených na 100°C byla velmi malá, byl tedy přítomen spíše amorfni HAP, což je ovšem lepší pro jeho biodegradabilitu. Některé parametry přípravy byly zkoumány blíže, například u prvního způsobu přípravy při vyšším pH (11,5) bylo přítomno více oxidu vápenatého ve srovnání s nižším pH (7,0). Při postchemické úpravě při teplotě 1100°C nebyla zjištěna změna přítomnosti CaO, ovšem při rychlém ochlazení vzorků k tvorbě CaO nedošlo. U druhého způsobu přípravy, kde se pH neměnilo, byla zjištěna vysoká přítomnost CaO, která byla znovu snížena rychlým ochlazením po teplotní úpravě vzorku. Rychlost míchání byla u třetího způsobu zkoumána při pomalém míchání a při intenzivním míchání. Při pomalém míchání byla v produktu přítomna bifáze (HA/TCP). [14]

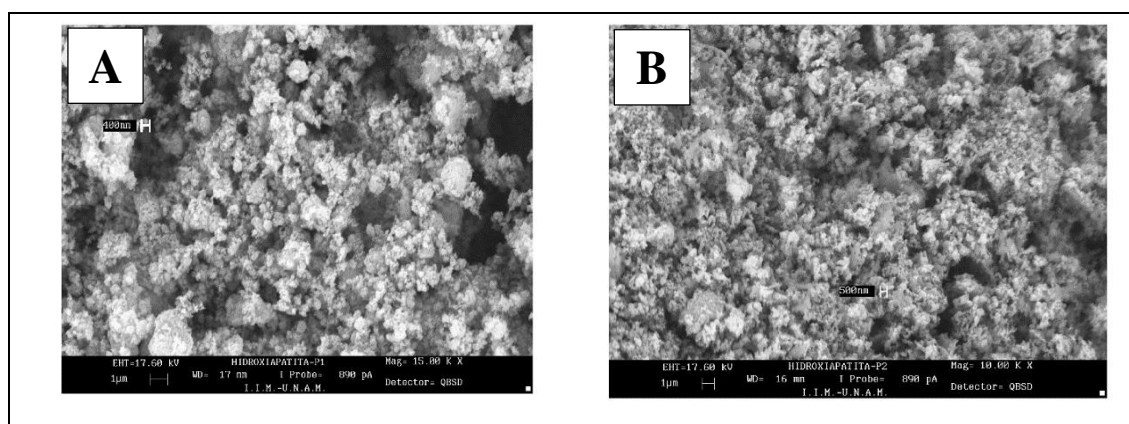
Mostafa ve své práci z roku 2005 [15] uvedl postup, při kterém použil nejprve čistý prášek uhličitanu vápenatého, který zahříval po dobu 4 hodin při teplotě 1100°C, aby vznikl oxid vápenatý. 56 g CaO bylo následně rozpuštěno ve 3 litrech vroucí destilované vody pro vznik hydroxidu vápenatého. Při přípravě stechiometrického HAP (s-HAP) byla kyselina fosforečná (0,5 mol/l) pomalu přikapávána k hydroxidu, dokud nebylo dosaženo molárního poměru Ca/P = 1,7. Míchání probíhalo další 2 hodiny a poté byl z baňky odstraněn supernatant. K suspenzi byly přidány další 2 litry vody a roztok byl míchán další 2 hodiny pro odstranění přebytečného hydroxidu vápenatého. Promytí bylo provedeno několikrát pomocí H₃PO₄ (0,001 mol/l). Ca-deficitní HAP (d-HAP) byl připraven pomalým přidáváním vodného roztoku octanu vápenatého (0,1 mol/l) a K₂HPO₄ (0,06 mol/l), s molárním poměrem 1,67, do jednoho litru vroucí vody.

Precipitát byl ponechán stárnout po dobu 2 hodin při 100°C a poté nechán chladnout po dobu 24 hodin. Finální pH bylo slabě kyselé (5,0). Mechanochemický HAP (m-HAP) byl připraven smícháním hydroxidu vápenatého s hydrogenfosforečnanem diamonným v poměru 1,67 v baňce se zirkoniovými kuličkami jako drtícím médiem a destilovanou vodou. Drcení probíhalo po dobu 8 hodin při rychlosti rotace 170 RPM ve vysokohustotní PE lahvi. Poté byl produkt přefiltrován a promyt čerstvě vařenou destilovanou vodou. Všechny vzorky byly sušeny po N₂, při 105°C po dobu 24 hodin a poté kalcinovány při 600°C po dobu 2 hodin. U produktů nebyla přítomna žádná další fáze, kromě HAP. U stechiometrického HAP byl molární poměr 1,67, u deficitního HAP byl poměr 1,58 a u mechanochemického HAP byl poměr 1,65. Mechanochemická metoda připravila HAP s částice s největším povrchem (86 m²/g), naopak nejmenší povrch měly částice vytvořené při deficitním poměru (19 m²/g). Částice vytvořené při mechanochemické metodě měly nejmenší krystalky (57 nm), při stechiometrické metodě měly 141 nm a naopak při deficitním poměru byly krystalky největší, jejich velikost se pohybovala okolo 212 nm (Obr. 5). [15]



Obrázek 5. Analýza částic vytvořených Mostafa a kol. [15] (A) Distribuce vzniklých částic HAP. (B) Snímky ze SEM - (a) s-HAP, (b) m-HAP, (c) d-HAP.

Precipitační i sol-gel metodu použili ve své práci Vázquez a kolektiv [16]. Pro syntézu precipitační metodou byly použity dva postupy lišící se vstupními reaktanty. V prvním případě byl použit 100 ml roztoku hydroxidu vápenatého (1 mol/l), do kterého bylo přidáváno 100 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (0,6 mol/l) rychlostí 7 ml/min. Směs byla ohřívána na 90°C po dobu jedné hodiny pro započetí reakce a poté ponechána míchat po dobu další hodiny. Během stárnutí při pokojové teplotě byl HAP filtrován a promyt destilovanou vodou. Vysušený prášek byl kalcinován při 850°C po dobu 4-6 hodin. Produkt byl krystalický. Druhým precipitačním způsobem byl HAP vytvářen pomocí 300 ml tetrahydrátu dusičnanu vápenatého (1 mol/l), do kterého bylo přidáváno 200 ml hydrogenfosforečnanu diamonného (0,6 mol/l) rychlostí 22 ml/min a 14 ml hydroxidu amonného. Systém byl udržován při 95°C po dobu jedné hodiny. Směs byla ponechána stárnout 14 dní při laboratorní teplotě, poté byl precipitát filtrován a promyt destilovanou vodou. Sušení probíhalo při teplotě 250°C po dobu 3 hodin a kalcinace při 850°C. Při metodě sol-gel byl použit triethylfosfát, tetrahydrát dusičnanu vápenatého a 2-metoxyethanoether. K získání molárního poměru 1,667 bylo použito 23,483 g tetrahydrátu, 10,2 ml triethylfosfátu a 15,6 ml etheru. Směs byla míchána, dokud nebylo dosaženo homogenní směsi. Krystalky tetrahydrátu a 2-metoxiethanol byly umístěny do Erlenmayerovy baňky, míchány a poté byl přidán triethylfosfát. Směs byla ponechána stárnout 4 dny při teplotě 80°C. Pro započetí gelačního procesu byla baňka otevřena a přehřívána na 90-100°C. Na konci byl pozorován nažloutlý gel, který byl vysušen, promyt a poté kalcinován při 1200°C po dobu 12 hodin. Při obou precipitačních procesech byl přítomen v produktu pouze HAP, při procesu sol-gel byl přítomen CaO a CaCO₃. Klastry HAP měly homogenní velikost. Průměrná velikost byla 400 nm pro první precipitační



Obrázek 6. Snímky ze SEM z práce Vázquez a kol. [16] (A) částice získané první precipitační metodou. (B) částice získané druhou precipitační metodou.

proces, 500 nm pro druhý precipitační proces (Obr. 6) a 300 nm pro sol-gel metodu. I když precipitační metody závisí významně na pH, době stárnutí, teplotě a podobně stále

jsou efektivnější a levnější než metoda sol-gel. Stechiometrie dosažená při precipitačních procesech byla menší než 1,67, ovšem při sol-gel metodě byl HAP stochiometrický a také velmi čistý a homogenní. [16]

Mobasherpour a kol. [17] použili pro přípravu HAP následující postup. Suspenze tetrahydrátu dusičnanu vápenatého (0,24 mol/l) o objemu 350 ml byla intenzivně míchána při teplotě 25°C. K tomuto roztoku byl po kapkách přidáno 250 ml hydrogenfosforečnanu diamonného (0,29 mol/l). Hodnota pH byla udržována na 11. Precipitát byl následně centrifugován při 3000 RPM a sušen při 80°C. Kalcinace následně probíhala při 100, 450, 900 a 1200°C po dobu 1 hodiny. Produkt byl po sušení analyzován pomocí FTIR. Píky na 560-610 a 1000-1100 cm^{-1} jsou PO_4^{3-} a píky OH^- jsou na 636 a 3572 cm^{-1} . Na XRD bylo zjištěno, že po kalcinaci s rostoucí teplotou rostla intenzita píku spektra. Tedy s rostoucí teplotou se tvořily více hexagonální-dipyramidové nanokrystaly. Ze snímků z TEM bylo zjištěno, že po sušení byly částice spíše sférické o velikosti 8-20 nm. Když se teplota vyšplhala na 1200°C, velikost vzrostla k 40-50 nm a morfologie je spíše hexagonální. V rozmezí teplot 100-1200°C je zaznamenán růst velikosti nanokrystalů, viz Tabulku 1, ovšem důvod tohoto růstu není znám. [17]

Monmaturpoj ve své práci [21] uvedl postup pro přípravu nanočástic hydroxyapatitu, kde použil jako výchozí látky tetrahydrát dusičnanu vápenatého a hydrogenfosforečnan diamonný v koncentračních poměrech 0,1:0,06 mol/l, 0,5:0,3 mol/l a 1:0,6 mol/l. Oba tyto reaktanty byly rozpuštěny v deionizované vodě a pH obou roztoků bylo upraveno na hodnotu 11. Pomalé přikapávání dusičnanu k hydrogenfosforečnanu způsobilo tvorbu mléčného a trochu želatinového precipitátu. Po hodině míchání byla suspenze refluxována při 100°C po dobu 1 hodiny a následně ponechána stárnout 24 hodin. Po této době byl produkt vysušen při 80°C (24 hodin) a rozdrcen pomocí třecí misky a paličky. Kalcinace produktu probíhala při teplotách 800, 1000 a 1200°C po dobu 1, 2 a 4 hodin. Vzorky vzniklé z nejnižších koncentrací výchozích látek měly nejvyšší hustotu, například u vzorku bez refluxu byla hustota 6,22 g/cm^3 . Velikost částic byla ovšem nejmenší u vzorků, které byly vytvořeny z nejvyšších koncentrací, kdy naopak hustota vzniklých částic byla nejnižší. Nejvyšší specifický měrný povrch měl vzorek vytvořený z nejvyšších koncentrací bez refluxu. Všechny rozměry jsou uvedeny v tabulce 2. Vzorky po kalcinaci

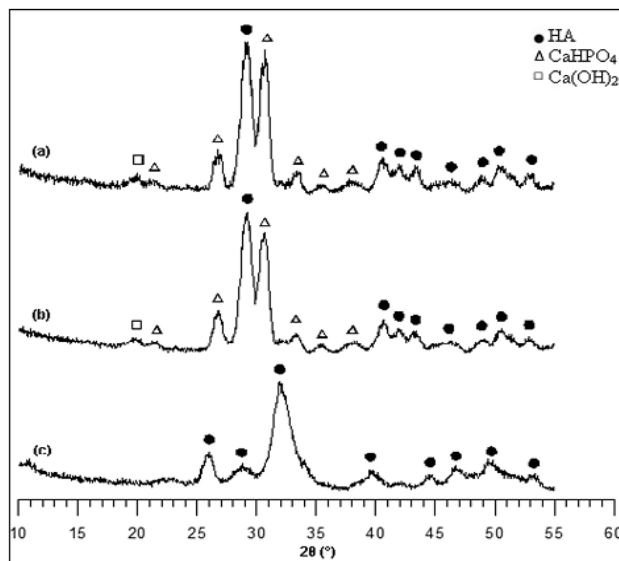
vykazovaly největší přítomnost hydroxyapatitu s minimální přítomností fosforečnanu vápenatého. Krystalinita produktu byla ovlivněna teplotou kalcinace, kdy při nejvyšší teplotě (1200°C) byla krystalinita zvýšená. [21]

Tabulka 2. Souhrn výsledků analýzy částic HAP připravených v práci Monmaturpoj z roku 2008. [21]

Vzorek	Velikost částic (μm)	Hustota (g/cm ³)	Specifický měrný povrch (m ² /g)
(s refluxem)			
S1	19,33	4,05	89,59
S2	26,64	2,92	-
S3	15,91	2,94	89,92
(bez refluxu)			
S4	20,83	6,22	80,49
S5	22,13	2,79	-
S6	4,48	2,81	97,4
(reakce 48 hodin)			
S7	17,66	3,03	90,86
S8	22,06	2,84	-
S9	15,93	2,77	79,45

Vliv metody míchání precipitátu popsali ve své práci Yoruç a kolektiv [20]. K přípravě HAP použil hydroxid vápenatý a kyselinu trihydrogenfosforečnou v molárním poměru Ca/P = 1,67. Obě látky byly rozpuštěny v destilované vodě a za stálého míchání přidávány k sobě (kyselina k hydroxidu). Míchání bylo prováděno magneticky (300 RPM, 1 hodina), ultrasonicky (320 W, 35 kHz, 1 hodina) a poté oběma dohromady. Vzniklé suspenze byly promyty několikrát destilovanou vodou a vysušeny pomocí lyofilizátoru. Při použití obou technik zvlášť byla zjištěna přítomnost Ca(OH)₂, CaHPO₄ a HAP. Ovšem při použití obou metod míchání dohromady byla přítomna pouze fáze HAP (Obr. 7). Velikosti částic u prvních dvou technik se pohybovaly okolo 100 nm, zatímco u použití dvojitého míchání byly částice velikostně okolo 50 nm. Specifický

měrný povrch byl nejvyšší u metody ultrasonické ($14,31 \text{ m}^2/\text{g}$) a nejnižší při použití obou technik ($5,32 \text{ m}^2/\text{g}$). [20]



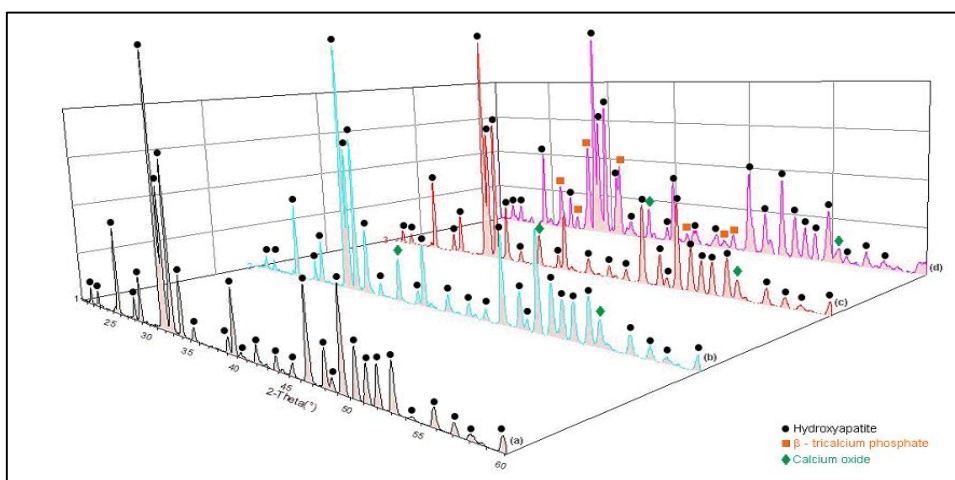
Obrázek 7. XRD spektrum HAP z práce Yoruç a kol. [20] (a) magnetické, (b) ultrasonické, (c) dvojité míchání.

Angelescu a kol. popisují, ve své práci z roku 2011 [22], vliv některých podmínek, které při precipitační reakci ovlivňují vznikající hydroxyapatit. Jako výchozí reaktanty byly použity hydroxid vápenatý a kyselina trihydrogenfosforečná. Nejprve byl připraven roztok hydroxidu, kdy bylo rozpuštěno 168 g pevného hydroxidu vápenatého ve 114 ml destilované vody a dále se připravil roztok 9 ml kyseliny ortofosforečné v 78 ml destilované vody. Pro úpravu pH na hodnotu 10,5 byl použit hydroxid amonný. Kyselina byla přikapávána do roztoku hydroxidu, který byl udržován při teplotě 75°C , rychlostí 1 a 10 ml/min. Rychlost míchání byla 300 a 1000 otáček za minutu. Po skončení adice kyseliny byly směsi ponechány stárnout 2 a 48 hodin. Pro odstranění nečistot byl precipitát vždy několikrát promyt destilovanou vodou. Přefiltrované vzorky byly sušeny při teplotě 110°C po dobu 24 hodin a poté rozemlety na prášek. V posledním kroku byly vzorky zahřívány na 1200°C po dobu 3 hodin a poté rozemlety pomocí planetárního mlýnku s kuličkami z karbidu wolframu. Ve výsledku byly 4 vzorky připravené za různých podmínek (Tabulka 3).

Tabulka 3. Podmínky precipitačních reakcí při práci Angelescu a kol. [22]

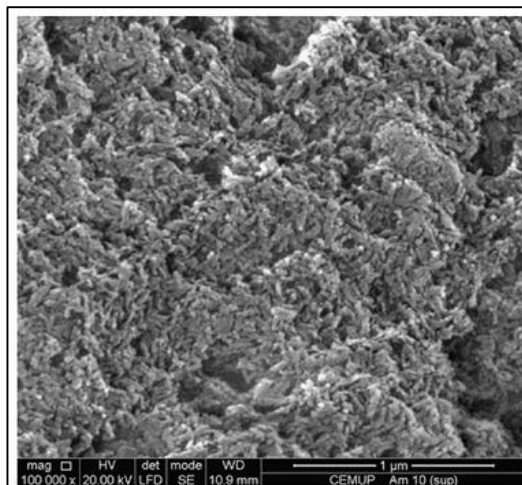
vzorek	koncentrace	teplota	Rychlost adice (ml/min)	Rychlost míchání (RPM)	Doba stárnutí (h)
1	2 M	75°C	1	1000	48
2			10	1000	48
3			1	300	2
4			10	300	2

Z analýzy rentgenovou difrakcí zobrazené na Obr. 8 můžeme vidět, že u prvního vzorku byla přítomna pouze jedna fáze - a to hydroxyapatit. V případě 2. a 3. vzorku se objevilo malé množství oxidu vápenatého a u čtvrtého vzorku byla přítomna ještě fáze β -fosforečnanu vápenatého. U všech vzorků byla zjištěna vysoká krystalinita a velikost krystalů v měřítku nanometrů, přesněji 97 % a 41 nm u prvního vzorku, 98 % a 45 nm u vzorku druhého, 97 % a 45 nm u vzorku číslo 3 a 92 % a 37 nm u posledního vzorku. Rychlost přikapávání kyseliny se jeví jako velice důležitý faktor, který ovlivňuje vznik sekundárních fází jako fosforečnan vápenatý, a v důsledku toho rychle klesá hodnota pH při konci reakce. Poklesem pH pod hodnotu 7 dochází k nekompletní disociaci kyseliny fosforečné a tedy absenci PO_4^{3-} iontů potřebných k tvorbě hydroxyapatitu. Rychlost míchání a doba stárnutí měly velký vliv na krystalinitu produktu, tedy přesněji, čím vyšší byla rychlost míchání, tím větší krystalinity bylo dosaženo. [22]



Obrázek 8. Graf rentgenové difrakce (Angelescu a kol.) syntetizovaných vzorků hydroxyapatitu, připravených při výše uvedených podmínkách. [22]

Charakterizací hydroxyapatitu vytvořeného při teplotě 37°C se zabývali Castro a kol. ve své práci publikované v roce 2012 [23]. Syntéza probíhala smícháním stejného objemu ($0,5 \text{ dm}^3$) hydroxidu vápenatého a kyseliny ortofosforečné v různých molárních poměrech Ca/P, a to 1, 1,33 a 1,67. Nasycený roztok ($19,3 \text{ mmol/dm}^3$ při teplotě 37°C) hydroxidu vápenatého byl připraven za teploty 25°C a ponechán míchat 24 hodin při 500 rpm. Roztoky hydroxidu i kyseliny byly připraveny v ultra čisté vodě a upraveny přidáním 6 ml 4M roztoku KCl. Kyselina

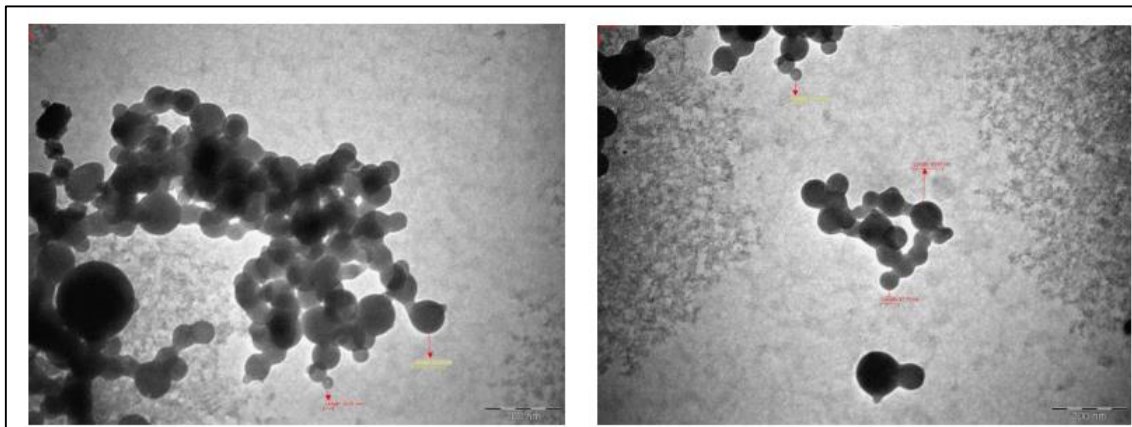


Obrázek 9. Snímek HAP s molárním poměrem Ca/P = 1,33 z práce Castro a kol. [23]

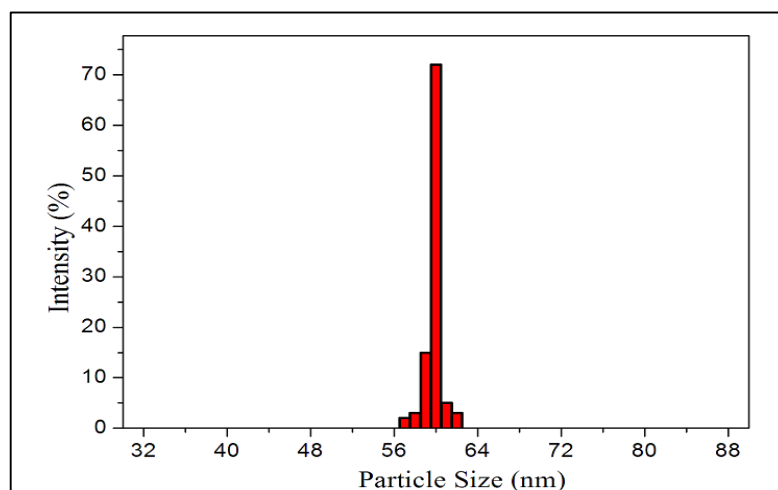
ortofosforečná byla přidávána rychlostí 26 ml/s a její koncentrace byla různá podle potřebného molární poměru ($11,5 \text{ mmol/l} - 19,3 \text{ mmol/l}$). Vzorky byly vyjmuty v různých časových intervalech, filtrovány a sušeny při teplotě 60°C po dobu 24 hodin. U všech vzorků byla přítomna fáze hydroxyapatitu, ovšem nejlepší výsledek jevil vzorek s molárním poměrem Ca/P = 1,33. U tohoto vzorku byla velikost částic asi $20 \times 100 \text{ nm}$ a jejich morfologie byla tyčinkovitá (Obr. 9). Molární poměr finálního produktu ovšem vzrostl až k 1,78, což je hodnota vyšší než stechiometrická hodnota HAP. Konečné pH produktu se blížilo hodnotě 7, to je velice dobré pro medicínské aplikace. Ve výsledku bylo zjištěno, že tato precipitační reakce měla tři fáze. První byla tvorba fosforečnanu vápenatého, poté docházelo k přeměně na hydroxyapatit a konečná fáze byla růst částic hydroxyapatitu. [23]

Nanočástice hydroxyapatitu z dusičnanu vápenatého a hydrogenfosforečnanu diamonného připravili Chandrasekar a kol. v roce 2013 [24]. Výchozí reaktanty byly připraveny v objemu 500 ml a koncentracích 1,2 M pro dusičnan a 0,8 M pro hydrogenfosforečnan. Dusičnan byl po dobu 4 hodin přikapáván k roztoku hydrogenfosforečnanu a pH bylo udržováno po celou dobu na hodnotě 10,8 pomocí 0,1 M roztoku hydroxidu sodného. Precipitát byl ponechán míchat přes noc a poté byl vakuově sušen a promyt třikrát destilovanou vodou a etanolem. Pomocí XRF a FTIR byla zjištěna převážná přítomnost hydroxyapatitu v produktu. Snímky z elektronového mikroskopu ukázaly sférickou strukturu částic a analýza EDX prokázala molární poměr Ca/P rovný 1,68, což je velmi blízké hydroxyapatitu přítomnému v lidských kostech. Velikost částic

byla měřena pomocí TEM a byla okolo 50 až 70 nm (Obr. 10), ovšem částice se shlukovaly do aglomerátů. Byla také provedena analýza pomocí DLS pro získání grafu distribuce velikosti částic ve vzorku (Obr. 11). Ta se shodovala s měřením provedeném na TEM. [24]



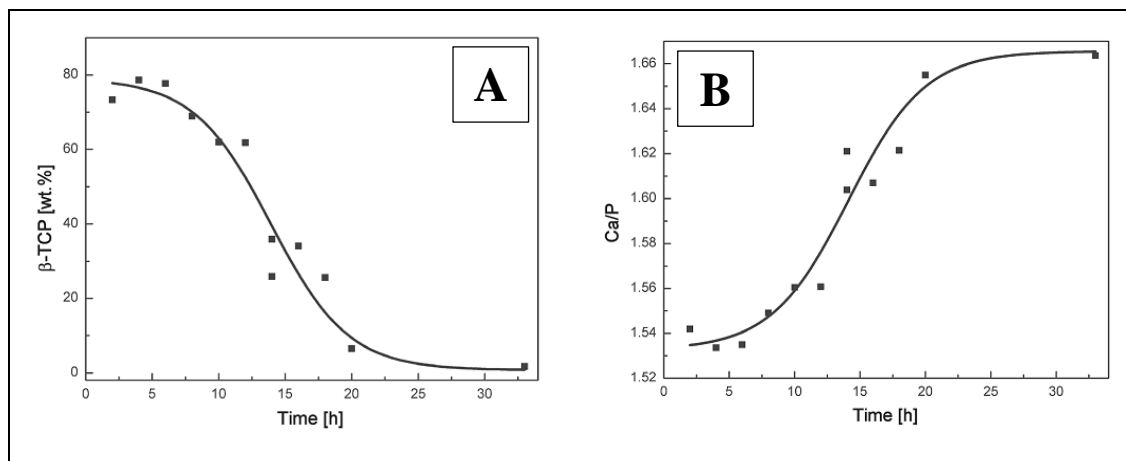
Obrázek 10. Snímek z TEM, zobrazující nanočástice HAP vytvořené v práci Chandrasekar a kol. [24]



Obrázek 11. Distribuce velikosti částic HAP z práce Chandrasekar a kol. [24]

Zyman a kol. se ve své práci z roku 2013 [25] zabývali změnou molárního poměru Ca/P během precipitační reakce. Roztok dusičnanu vápenatého byl rychlostí 900 ml/min přidán k roztoku hydrogenfosforečnanu diamonného v molárním poměru Ca/P rovnému 1,67. Hodnota pH byla po dobu reakce udržována na 11-12 pomocí roztoku NH_4OH a teplota reakce byla laboratorní, tedy přesněji 21°C . Vzorky byly vyjímány vždy po 2 hodinách v intervalu 0 až 32 hodin po skončení precipitace. První polovina precipitátů byla sušena v peci při $60\text{--}70^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin a druhá polovina vzorků byla třikrát promyta destilovanou vodou a poté sušena při $60\text{--}70^\circ\text{C}$ po dobu 72 hodin. Všechny vzorky byly páleny při 1000°C po dobu 1 hodiny. Analýza probíhala pomocí XRF.

Ve vzorcích odebraných v intervalu 0-30 hodin byla zjištěna přítomnost β -TCP, která klesala s časem a až ve vzorku odebraném po 32 hodinách byl čistý HAP. Na Obr. 12 je vidět závislost přítomnosti fáze β -TCP na čase a časový vývoj molárního poměru Ca/P.



Obrázek 12. Časové vývoje produktu z práce Zymán a kol. [25] (A) Časový vývoj přítomnosti β -TCP v produktu. (B) Časový vývoj molárního poměru Ca/P v produktu.

Ve své diplomové práci se přípravou nanokrystalických fosforečnanů, například hydroxyapatitu, zabývala také Kateřina Míčková v roce 2013. [32] Ta k přípravě těchto fosforečnanů používala zajímavé chemikálie, jako například octan vápenatý, bis(pentan-2,4-dionato)vápenatý komplex a ethanolát vápenatý jako zdroje vápníku a dále trimethylester kyseliny fosforečné, triethylester kyseliny fosforečné, tributylester kyseliny fosforečné a další jako zdroje fosforu. Jako rozpouštědlo použila vodu, hexan a také izopropylalkohol. Metody přípravy byly voleny různě podle výchozích látek, jednalo se o sonolytické srážení, solvotermální reakce, ale také další. Mezi vznikající látky při reakcích patřily disfosforečnan vápenatý, orthofosforečnan vápenatý, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ a $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$. [32]

Jak již bylo výše zmíněno, na přípravu nanočástic hydroxyapatitu má vliv řada faktorů. Mezi ty nejdůležitější patří výchozí reaktanty a jejich koncentrace a dále reakční podmínky jako hodnota pH udržovaná v průběhu reakce, teplota a tepelné zpracování po reakci. Jedním z těchto faktorů, jevících se jako nejpodstatnější, je i doba stárnutí produktu, která má největší vliv na chemickém složení a krystalinitu, jelikož je prokazatelné, že se při přípravě právě hydroxyapatitu vytváří v průběhu i jiné fáze [25], mezi které patří β -TCP, CaO nebo OCP. Přítomnost těchto nežádoucích látek mizí většinou po 24 hodinách, kdy je v produktu už přítomen hlavně HAP. Krystalinita

produktu roste, mimo jiné faktory, i právě s časem, protože při reakci dochází k rozpouštění a rekrystalizaci. Ačkoliv se to může zdát irelevantní, vliv na přítomnost hydroxyapatitu v produktu mají i zvolené výchozí reaktanty a jejich koncentrace. Nejčastěji volenými látkami jsou hydroxid vápenatý a dusičnan vápenatý jako zdroj vápenatých iontů a kyselina ortofosforečná nebo hydrogenfosforečnan diamonný jako zdroj PO_4^{3-} iontů. Je důležité volit reaktanty tak, aby bylo v jejich chemické struktuře přítomno co nejméně nežádoucích prvků, které by mohly produkt znečistit a podpořit tvorbu jiných sloučenin než HAP. Jejich koncentrace je velmi důležitá při tvorbě sekundárních fází. Ty se tvoří při příliš vysokých koncentracích reaktantů, proto se často volí koncentrace maximálně 1 mol/l. Teplota a pH reakce jsou nejdiskutovanějšími podmínkami při přípravě HAP. Tyto dva faktory mají významný vliv hlavně na velikost a morfologii částic. Ze zkoumaných příprav v této kapitole je možné usoudit, že například při hodnotě pH vznikají se vzrůstající teplotou částice o menší velikosti, ale také při stejné teplotě a vzrůstající hodnotě pH se tvořily částice menší. Většina autorů využívá kromě sušení produktu také tepelné zpracování při vyšších teplotách. Tyto vysoké teploty by mohly mít hlavně vliv na stabilitu částic, jejich hustotu, ale také na velikost částic a jejich krystalinitu. To ve své práci potvrdil Muralithan a kol. [26]. Často zmiňovaný faktor ovlivňující tvorbu sekundárních fází při přípravě HAP je také postup a rychlost mísení reaktantů. Nejčastěji je přidávána látka s nižším pH k látce s vyšší hodnotou pH, a proto při prudkém smíchání reaktantů dochází k rychlému poklesu celkového pH směsi. To potom způsobuje tvorbu právě sekundárních fází, jako například fosforečnanu vápenatého. Důvodem je nedokonalá disociace reaktantu, v tomto případě kyseliny, a následnému nedostatku PO_4^{3-} iontů potřebných k tvorbě hydroxyapatitu. Podle Angelescu a kol. [22] je také rychlost míchání důležitým faktorem pro krystalinitu produktu. Mícháním při nízkých otáčkách je dosaženo heterogenního prostředí a dochází k lokální koncentraci PO_4^{3-} iontů a tvorbě rozpustného precipitátu, což vede ke vzniku produktů s nízkou krystalinitou.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 CÍLE EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat zvolenou precipitační metodu a ověřit vliv reakčních podmínek na vznik a vlastnosti částic hydroxyapatitu. V průběhu práce byl zkoumán především vliv teploty a pH precipitační reakce na velikost a tvar připravených částic HAP.

Prvním úkolem experimentální části BP byla volba reaktantů a reakčních podmínek vhodných pro přípravu nanočástic hydroxyapatitu. Uvedené parametry byly zvoleny na základě provedené literární rešerše uvedené v kapitole 1.5. Samotná příprava HAP byla provedena jako série několika experimentů, jejichž parametry jsou uvedeny v Tabulce 3. Experimenty byly plánovány tak, aby umožnily ověření dopadu hlavních reakčních podmínek, jako jsou teplota a pH, na vznikající částice. V další fázi práce byly vytvořené nanočástice charakterizovány z hlediska tří nejvýznamnějších vlastností - tedy čistoty produktu, tak aby byla ověřena přítomnost hydroxyapatitu a sekundárních fází, molárního poměru hlavních složek, který je významný pro další aplikace a velikosti částic, aby byla potvrzena přítomnost nanočástic v produktu a jejich struktura. Na základě těchto analýz byl stanoven vliv jednotlivých podmínek reakce na vlastnosti HAP při použití zvolených reaktantů. Vzhledem k předpokládané aplikaci vytvořených nanočástic, tedy aplikaci pro medicínské účely, bylo u jednoho vybraného vzorku provedeno ověření biokompatibility.

2.2 SYNTÉZA NANOČÁSTIC

2.2.1 Použité chemikálie

Na základě literární rešerše a dostupnosti chemikálií byly jako hlavní reaktanty pro přípravu hydroxyapatitu precipitační metodou zvoleny:

- Hydrogenfosforečnan diamonný, p.a., $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, obsah min. 99%, Penta s.r.o.
- Dusičnan vápenatý tetrahydrát, p.a., $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, obsah min. 99%, Penta s.r.o.
- Demineralizovaná voda – použita jako rozpouštědlo, 0,08 $\mu\text{S}/\text{cm}$

pH bylo v průběhu jednotlivých experimentů upravováno dvěma činidly:

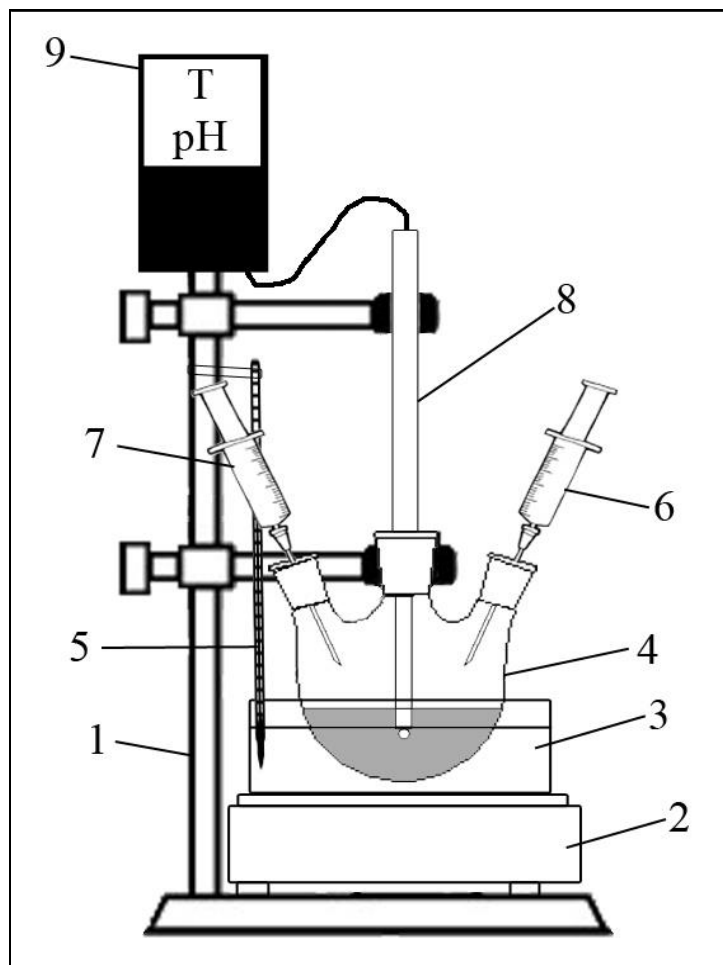
- Hydroxid amonný, p.a., NH_4OH , vodný roztok amoniaku (NH_3) min. 24%, Penta s.r.o.
- Hydroxid sodný, p.a., NaOH , Penta s.r.o. – použit roztok s koncentrací 1 mol/dm^3

2.2.2 Použitá metoda

Série experimentů s čísly 1 až 9 byla provedena podle schématu, viz Obr. 14, kdy byl použit tetrahydrát dusičnanu vápenatého o koncentraci $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$, který následně reagoval s hydrogenfosforečnanem diamonným o koncentraci $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$. Jako rozpouštědlo byla použita demineralizovaná voda a pro modifikaci pH byly použity 25% hydroxid amonný a 1M hydroxid sodný. Pro kontrolu pH byl použit měřicí přístroj Greisinger GMH3530. U experimentů byly měněny hodnoty teplot, v rozsahu 37°C až 80°C , a hodnoty pH, v rozsahu 9-11, viz Tabulku 4. Pokusy byly prováděny na aparatuře, která je zobrazena na Obr. 13.

Tabulka 4. Rozdělení experimentů podle podmínek reakce.

Číslo EXP	Teplota ($^\circ\text{C}$)	pH
1	37	9
2	37	10
3	37	11
4	50	9
5	50	10
6	50	11
7	80	9
8	80	10
9	80	11

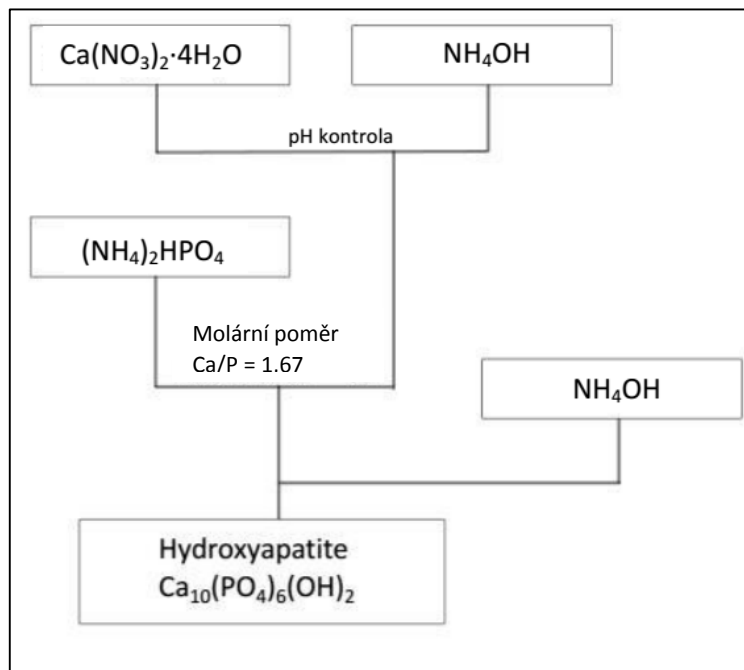


Obrázek 13. Schéma použité aparatury. (1) stojan, (2) magnetické míchadlo, (3) vodní lázeň, (4) trojhrdlé baňka s reaktanty, (5) teploměr, (6) injekční pumpa s $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (7) injekční pumpa s čínidlem pro úpravu pH, (8) elektroda pH metru, (9) pH metr

2.2.3 Postup syntézy

Příprava byla prováděna podle schématu na Obr. 14. Do trojhrdlé baňky bylo přidáno $1,5 \cdot 10^{-3}$ molů roztoku tetrahydrátu dusičnanu vápenatého, který byl za stálého míchání přiveden na teplotu stanovenou pro daný experiment. Po změření pH roztoku bylo do systému přidáno činidlo upravující pH k dosažení předem zvolené hodnoty. Po ustálení bylo za stálého míchání do roztoku postupně přidáváno $9 \cdot 10^{-4}$ molů hydrogenfosforečnanu diamonného. Dávkování bylo prováděno na přístroji Schumed Injectomat cp-PS rychlostí 25-30 ml/h. Během této reakce bylo pH udržováno na stejné hodnotě. Po skončení precipitace bylo znovu změřeno pH roztoku. Vzniklá suspenze byla ponechána stárnout 24 hodin za stálé teploty a míchání. Hodnota pH suspenze byla

změřena také po 24 hodinách. Naměřené hodnoty během syntézy jsou popsány v Tabulce 5. Po uplynutí této doby byla suspenze nanočástic opakovaně pročištěna centrifugací za účelem odstranění vedlejších produktů reakce. Stáčení probíhalo při 3000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut a poté bylo rozpouštědlo vždy vyměněno destilovanou vodou. Tento postup promývání byl proveden třikrát. V dalším kroku byly vzorky připravovány na analýzu.



Obrázek 14. Schéma použité při přípravě nanočástic hydroxyapatitu.

Tabulka 5. Provedení experimentů. pH₀ – hodnota pH roztoku Ca(NO₃)₂·4H₂O, V₁ – první přidavek činidla měnícího pH, pH₁ – hodnota pH po přidání objemu činidla V₁, V₂ – objem činidla přidaného pro udržení pH během reakce, pH_k – hodnota pH po skončení precipitace, pH₂₄ – hodnota pH po 24 hodinách.

EXP	Teplota (°C)	pH ₀	V ₁ (ml)	pH ₁	V ₂ (ml)	pH _k	pH ₂₄
1	37	5,73	0,3 (1M NaOH)	11,07	2 (1M NaOH)	9,44	9,35
2	37	5,85	0,55 (25% NH ₄ OH)	10,99	1,9 (25% NH ₄ OH)	10,18	10,02
3	37	5,89	0,4 (25% NH ₄ OH)	11,09	9,2 (25% NH ₄ OH)	10,80	10,76
4	50	7,47	0,04 (25% NH ₄ OH)	9,07	0,6 (25% NH ₄ OH)	9,00	9,08
5	50	7,11	1,5 (25% NH ₄ OH)	10,96	3 (25% NH ₄ OH)	9,99	9,87
6	50	7,77	1,5 (25% NH ₄ OH)	11,01	16 (25% NH ₄ OH)	10,90	10,87
7	80	7,03	0,04 (25% NH ₄ OH)	9,30	1,5 (25% NH ₄ OH)	9,00	9,01
8	80	6,7	0,35 (1M NaOH)	10,51	3,6 (1M NaOH)	10,36	10,13
9	80	6,95	9 (25% NH ₄ OH)	10,5	33 (25% NH ₄ OH)	10,26	10,18

2.3 ANALÝZA ČÁSTIC

2.3.1 Analýza velikosti částic v suspenzi – DLS

Měření velikosti částic pomocí DLS analýzy bylo prováděno na přístroji ZetaSizer Nano ZS ZEN360 od firmy Malvern Instruments pouze pro jednu sérii vzorků (EXP2), pro zjištění rychlosti aglomerace vznikajících částic a určení časového vývoje velikosti částic. Analýza byla provedena pro časovou sérii odběrů po 0, 2, 4, 18 a 24 hodin.

2.3.1.1 Příprava vzorků a měření

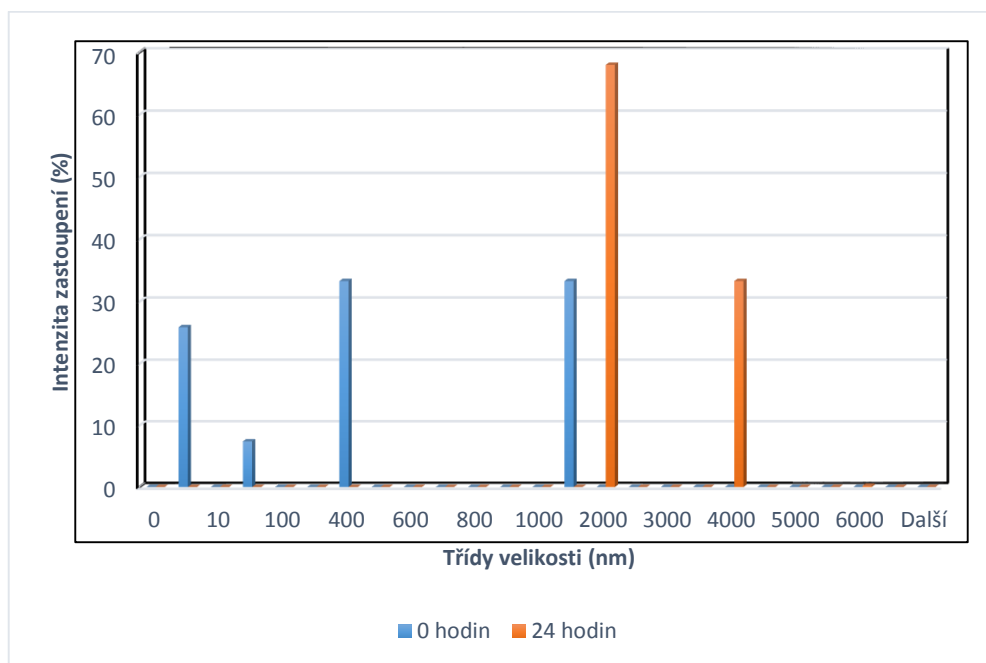
Pro měření velikosti vzniklých částic bylo nutné ředění suspenze nanočástic, aby byl přístroj pro disperzní analýzu schopen provést měření. Suspenze byly vždy zředěny destilovanou vodou v objemovém poměru 1:10 a následně řádně protřepány a případně sonifikovány. Pro analýzu byly použity 2,5 ml plastové kyvety. Vzorky byly analyzovány vždy v objemu 2 ml a při konstantní teplotě 25°C.

2.3.1.2 Výsledky a diskuze

Z výsledků v Tabulce 6 je zjevné, že se ve vzorcích nacházely částice o velikosti od několika nanometrů až po jednotky mikrometrů. Je tedy jasné, že částice ihned po precipitaci aglomerovaly a vytvářely klastry. Ačkoli nebyla při analýze odhalena jasná závislost velikosti vzniklých aglomerovaných částic, z výsledků je patrné, že jejich velikost v průběhu procesu stárnutí roste. Zatímco ve vzorcích odebraných v časech 0 a 2 hodiny byla pozorována přítomnost nanočástic, při dalších odběrech byla prokázána přítomnost pouze mikročástic, jejichž velikost se po 24 hodinách pohybovala mezi 1.95 a 5,55 μm . Na Obr. 15 graficky zobrazen rozdíl jednotlivých frakcí částic pozorovaných při odběru v nulté a 24. hodině.

Tabulka 6. Distribuce velikosti částic časových odběrů při experimentu číslo 2.

Časový odběr (h)	Velikost částic (nm)	Procentuální zastoupení (%)
0	393.7	33,3
	1484	33,3
	1.228	25,9
	10.1	7,4
2	1.656	50
	1.693	42,1
	0.6213	7,9
4	1556	50
	4948	50
18	1846	59,7
	2835	16,7
	5383	23,7
24	3699	33,3
	1953	68
	5560	0,2



Obrázek 15. Histogram distribuce velikostí částic při různých časových odběrech při experimentu číslo 2.

2.3.2 Analýza velikosti a tvaru nanočástic – SEM

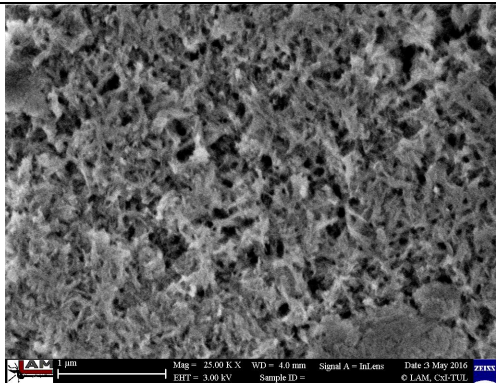
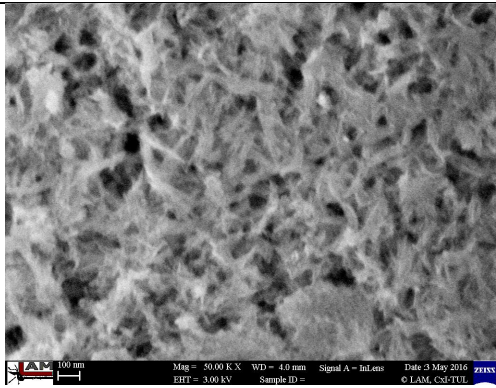
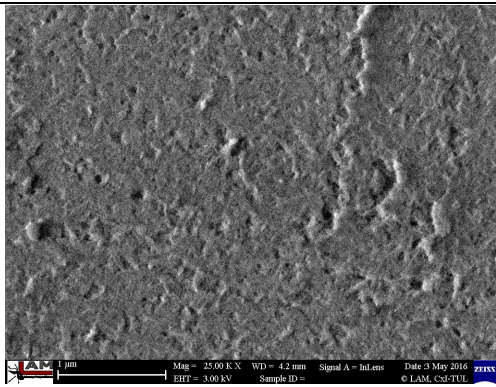
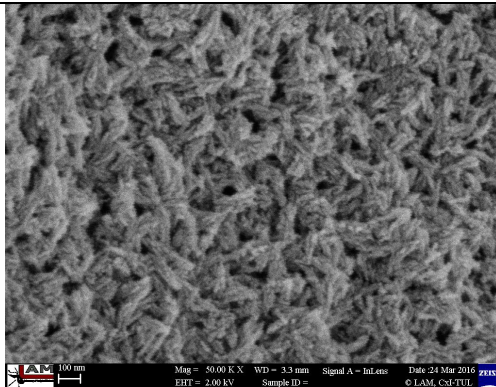
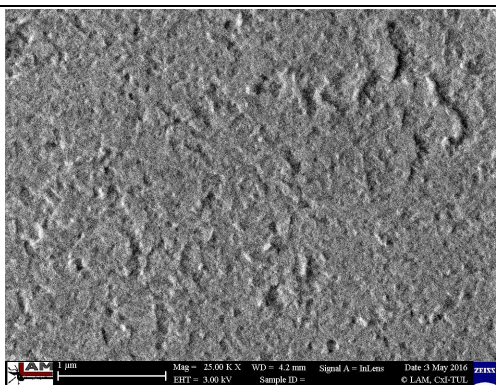
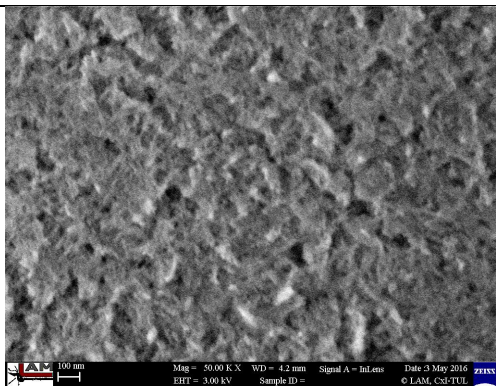
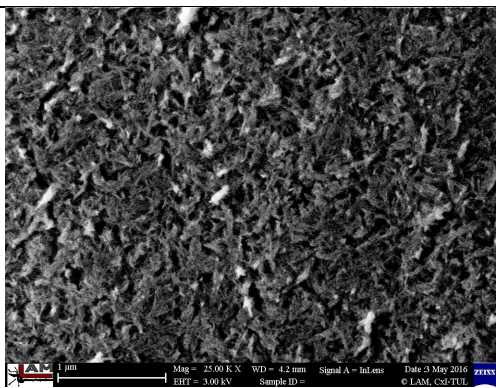
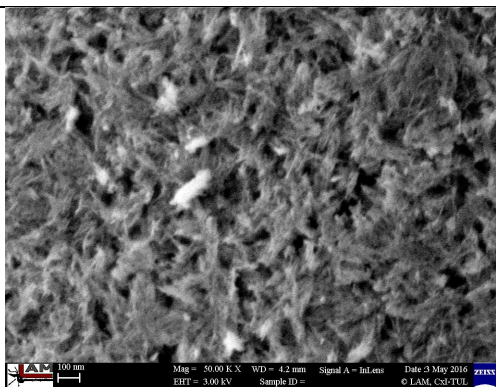
2.3.2.1 Příprava vzorků a měření

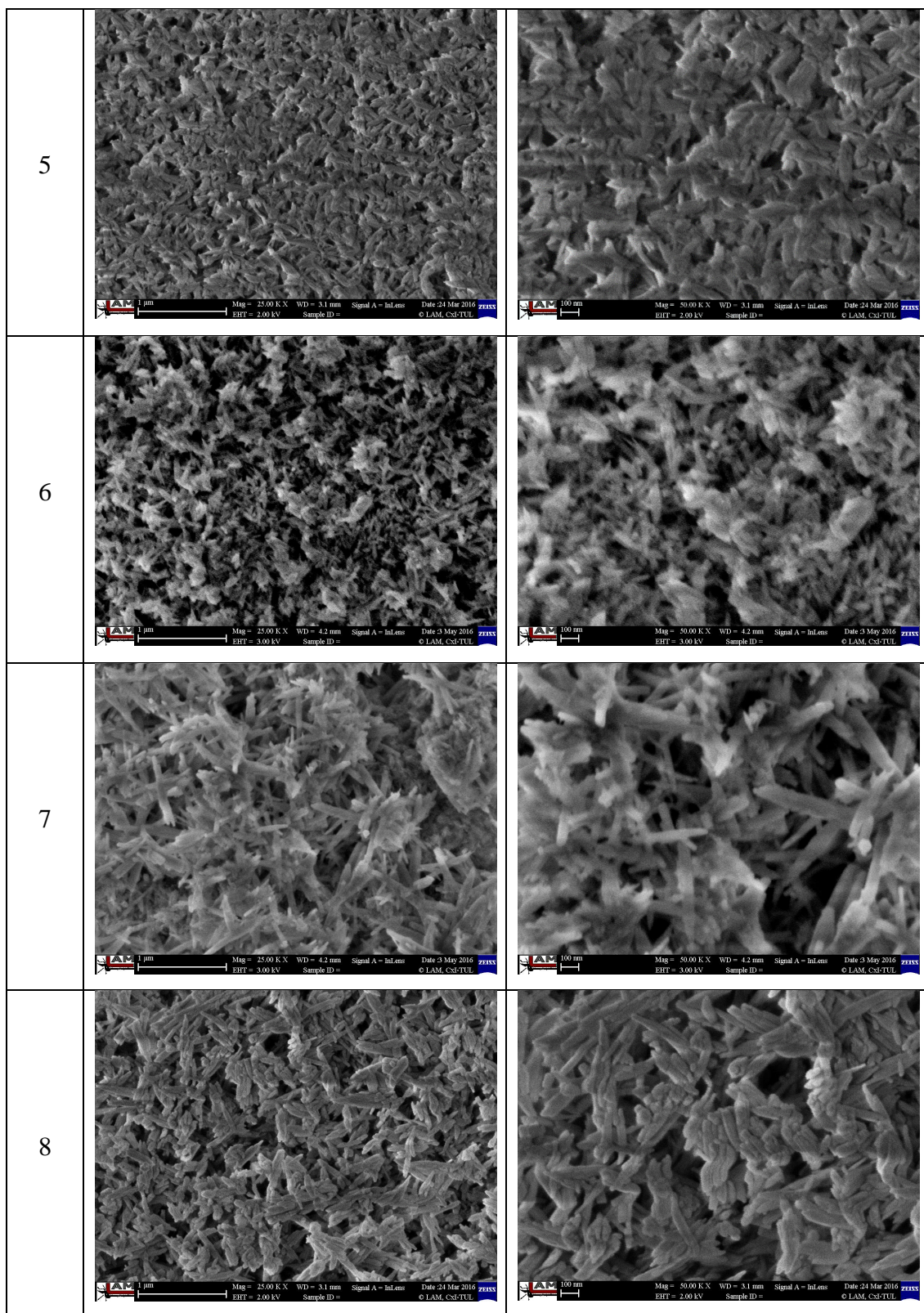
Pro tuto analýzu by použit přístroj Zeiss Ultra/Plus. Vzorky pro analýzu na rastrovacím mikroskopu byly připraveny ihned po promytí produktu. Postup byl následovný: 5 ml suspenze bylo nanášeno na Petriho misku vystlanou hliníkovou folií a dáno sušit na 24 hodin při teplotě 50°C. Následně se připravil terčík, na který se přilepila vodivá uhlíková lepicí páska. Na tuto pásku byl posléze nanášen vysušený vzorek. Pro vytvoření snímků na elektronovém mikroskopu byl pro lepší rozlišení vzorek pokoven 1 nm platiny. Analýza chemické struktury probíhala na přístroji Zeiss Ultra/Plus při urychlovacím napětí 10kV. Nabíjení vzorku bylo kompenzováno lokálním přifukováním dusíku.

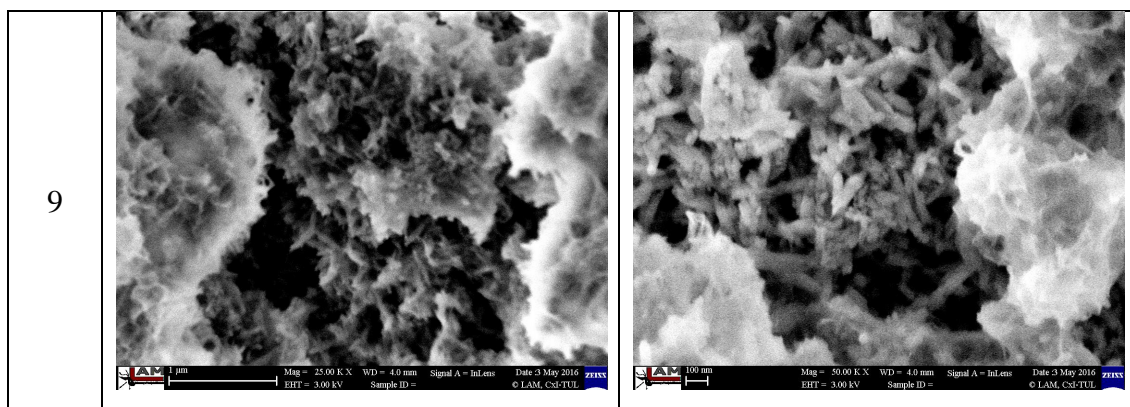
2.3.2.2 Výsledky a diskuze

Analýza pomocí elektronové mikroskopie prokázala přítomnost nanočástic (submikronových) ve všech připravených vzorcích viz Tabulku 7. U vzorků připravených experimenty provedenými při 37°C a 80°C, tedy experimenty 1, 2, 3 a 7, 8, 9, byla pozorována prokazatelná závislost velikosti částic na pH reakce. Rozměr nanočástic s rostoucím pH klesal. U experimentů provedených při teplotě 50°C (experimenty 4, 5 a 6) byla pozorována spíše rostoucí závislost velikosti částic na pH. To je ovšem pouze subjektivní hodnocení snímků ze SEM. Měření velikosti částic bohužel nebylo možné provést u všech připravených vzorků z důvodu příliš malých rozměrů nanočástic, které nebylo na SEM možné zobrazit v dostatečné kvalitě. U všech vytvořených vzorků byly pozorovány částice přibližně jehličkovitého tvaru. U experimentů 1 – 4, 6 a 9 nebylo možné měření rozměrů nanočástic. U experimentu 5 byla průměrná velikost částic $(200 \pm 30 \times 70 \pm 10)$ nm, u experimentu 7 to bylo $(580 \pm 100 \times 90 \pm 30)$ nm a u posledního změřeného experimentu číslo 8 byla velikost částic $(270 \pm 60 \times 70 \pm 20)$ nm.

Tabulka 7. Snímky vzorků z elektronového mikroskopu zobrazující strukturu připravených částic HAP.

EXP	Zvětšení 25 000×	Zvětšení 50 000×
1		
2		
3		
4		





2.3.3 Chemické složení – EDS

2.3.3.1 Příprava vzorků a měření

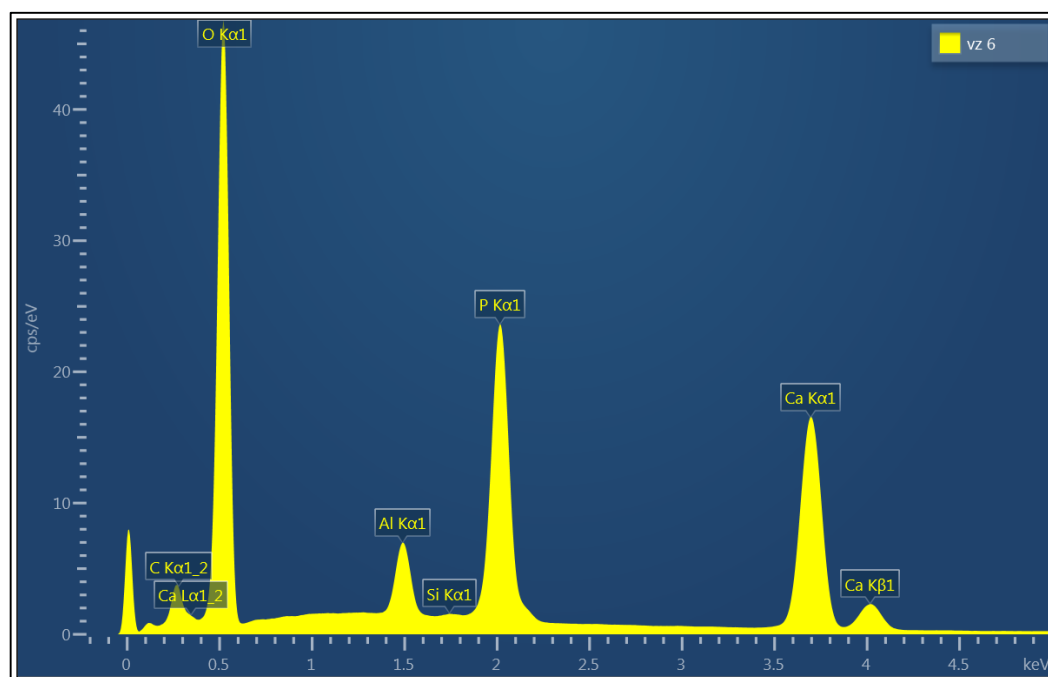
Analýza chemického složení byla provedena na rastrovacím elektronovém mikroskopu Zeiss Ultra/Plus s jednotkou EDS Oxford X-max 20 při urychlovacím napětí 10kV. Použitý software byl AZtec. Nabíjení vzorku bylo kompenzováno lokálním přifukováním dusíku. Vzorek byl nalepen na vodivou uhlíkovou pásku, která byla připevněna na terčiku. Pro analýzu chemického složení pomocí jednotky EDS nebyl vzorek pokoven ani upraven.

2.3.3.2 Výsledky a diskuze

Z provedených experimentů se požadovanému molárnímu poměru vápníku k fosforu 1,67 nejvíce přiblížil experiment číslo 6, a to poměrem 1,653, jehož spektrum z EDS je na Obr. 16. V Tabulce 8 jsou uvedeny molární poměry Ca/P dosažené u jednotlivých vzorků HAP. Velké odchylky mohou být způsobeny tvorbou sekundárních fází při precipitační reakci a procesu stárnutí. U vzorků byla také přítomna kontaminace hliníkem, která byla způsobena sušením vzorku na hliníkové folii. Přítomnost sodíku mohla být způsobena nedokonalým promytím produktu od použitého hydroxidu sodného. U všech vzorků se objevil také křemík, ten mohl být uvolněn v průběhu reakce ze skleněné trojhrdlé baňky. U všech experimentů se na grafu ukázalo také malé množství uhlíku, to mohlo být ovšem způsobeno nalepením vzorku na uhlíkovou vodivou pásku při přípravě vzorku pro analýzu.

Tabulka 8. Výsledky energiově-disperzní analýzy.

Číslo experimentu	Molární poměr Ca/P
1	1,91
2	1,7
3	1,648
4	1,63
5	1,716
6	1,653
7	1,81
8	1,857
9	2,03



Obrázek 16. Spektrum EXP6 z EDS analýzy.

2.3.4 Analýza chemického složení – Ramanova spektrometrie

2.3.4.1 Příprava vzorků a měření

Analýza byla prováděna na přístroji Nicolet DXR Microscopy. Vysušený vzorek bylo nutné nejprve připevnit na kovovou destičku tak, aby byl povrch analyzované části co nejrovnější. Poté se destička vloží do přístroje a pomocí optického mikroskopu se zaostří na vzorek. Pro analýzu se používá software OMNIC. V nastavení byly zvoleny

tyto parametry měření - viz Tabulku 9. Parametry se volí tak, aby byl pokud možno nejsilnější signál, ale vzorek nebyl tepelně laserem degradován a byla nejslabší případná fluorescence.

Tabulka 9. Nastavení měření na Ramanově spektroskopu

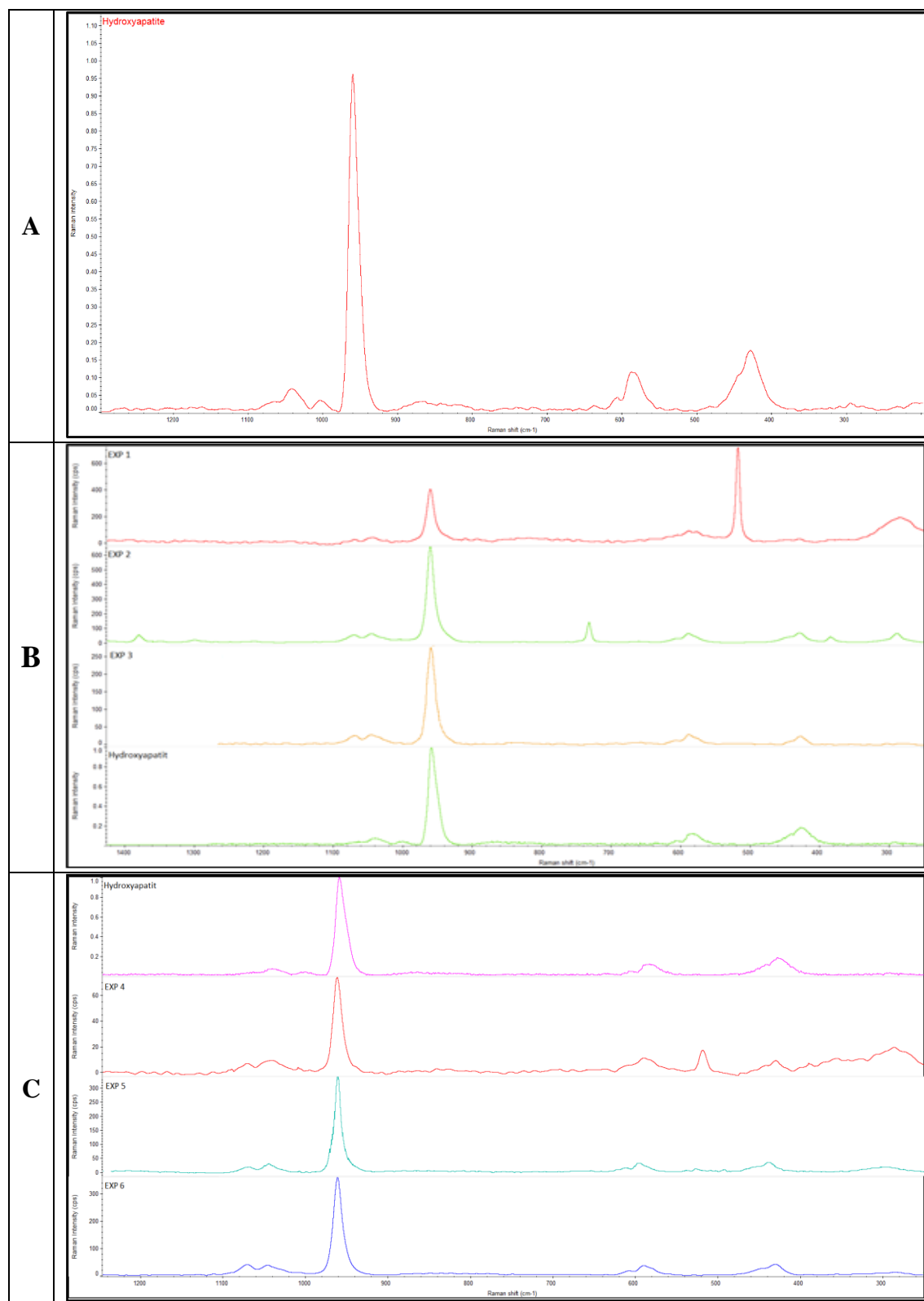
Objektiv	10×
Apertura	50 μm
Výkon laseru	10 mW
Grating	900 lines/min
Expoziční čas	1-2 s
Počet expozic	500

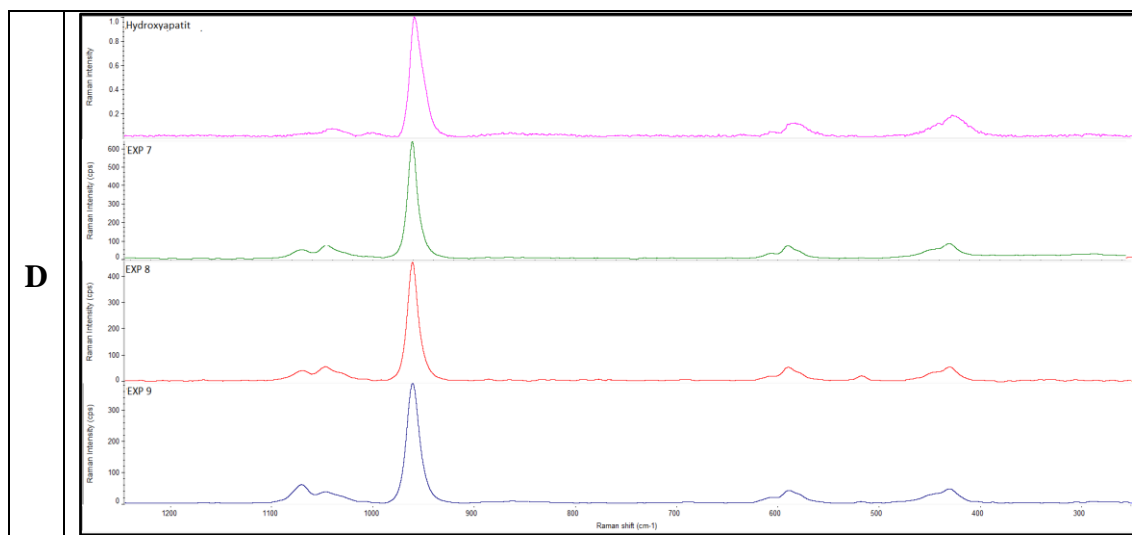
V tomto případě bylo možno zvolit největší aperturu a největší výkon laseru, protože vzorek nevykazoval silnou fluorescenci a nepodléhá tepelné degradaci. Měření každého vzorku probíhalo několik minut, kdy se s každou expozicí laseru na vzorek snižoval šum. Po měření bylo nutné provést několik úprav, jako například korekci fluorescence vzniklé při měření, korekce na tzv. baseline (základna). Spektrum bylo analyzováno pouze do 1800 cm^{-1} , protože jako většina vzorků tohoto typu (anorganické soli) apatity nemají absorpční pásy nad 1800 cm^{-1} .

2.3.4.2 Výsledky a diskuze

Výsledky z Ramanovy spektrometrie potvrdily u všech vzorků shodu s knihovním spektrem hydroxyapatitu. Nejdůležitějšími maximy spektra jsou vazby PO_4^{3-} , které se vyskytují na vlnočtech 431, 590, 960 a 1049 cm^{-1} . Největší intenzitu má 960 cm^{-1} patřící vibračním symetrické PO_4^{3-} vazbě. V Tabulce 10 je zobrazeno knihovní spektrum hydroxyapatitu a porovnání spekter provedených experimentů mezi sebou a s knihovním spektrem HAP.

Tabulka 10. Spektra z Ramanova spektrometru. (A) knihovní spektrum hydroxyapatitu, (B) srovnání spekter experimentů 1-3 se spektrem HAP, (C) srovnání spekter experimentů 4-6 se spektrem HAP, (D) srovnání spekter experimentů 7-9 se spektrem HAP.





2.3.5 Ověření biokompatibilit – MTT

Pro testování biokompatibilit byl použit vzorek z experimentu číslo 6, z důvodu nejlepšího dosaženého molárního poměru Ca/P. Pro měření byl použit přístroj Multi-mode microplate reader Synergy HTX od firmy BioTek Instruments.

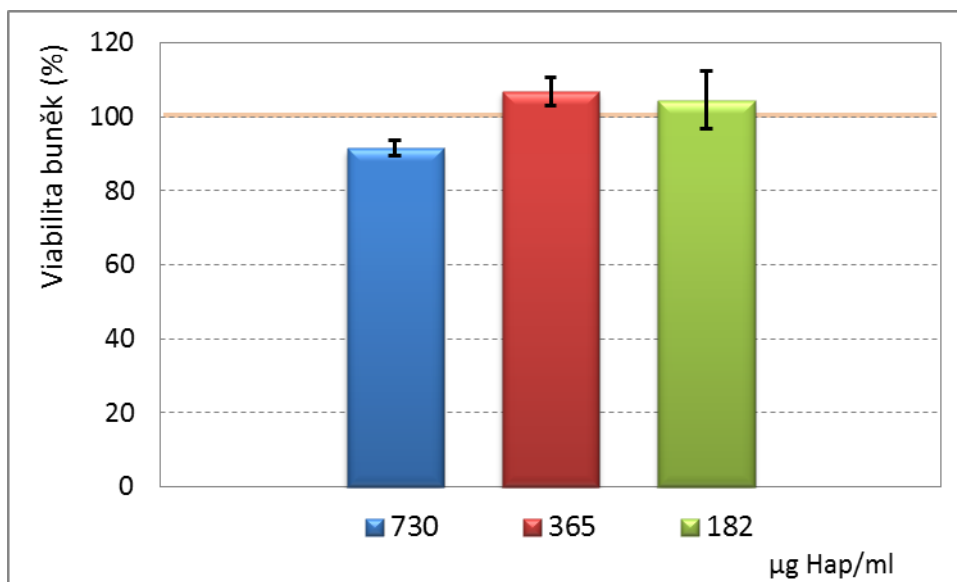
2.3.5.1 Příprava vzorků a měření

Testování cytotoxicity bylo provedeno na stabilní buněčné linii 3T3 při standardních podmínkách pro kultivaci (37°C, 5% CO₂). Kultivace buněk probíhala v Dulbeccově modifikovaném Eaglově médiu s příměsí 5% fetálního bovinního séra a 5% calf séra a dalších standardních aditiv. Cytokompatibilita hydroxyapatitu byla testována v přímém kontaktu s buněčnou linií po dobu 24 hodin. Suspenze nanočástic byly připraveny ve třech koncentracích, a to 730 µg/ml, 365 µg/ml a 182 µg/ml, a buněčná suspenze byla připravena tak, aby po smíchání obsahoval vzorek 30×10³ buněk/ml. Suspenze byla nasazena na sterilní kultivační plastik a po 24 hodinách byla vyhodnocena viabilita buněk ve srovnání se standardem. Testování bylo opakováno třikrát. Vyhodnocení viability bylo provedeno metodou MTT, spočívající ve vystavení buněčné kultury roztoku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu, který má žlutou barvu, a metabolickou aktivitou buněk se barva mění na modrou značící formazan. Po 2 hodinách metabolické přeměny bylo množství formazanu analyzováno měřením absorbance na vlnové délce 570 nm. Viabilita byla vyhodnocena jako podíl hodnot vzorku a standardu, viz (3).

$$Viabilita = \frac{a_{vzorek}}{a_{standard}} * 100 (\%) \quad (3)$$

2.3.5.2 Výsledky a diskuze

Na Obr. 17 jsou shrnuty výsledky viability buněčné linie 3T3 po vystavení HAP. Je zjevné, že ve srovnání se standardem, který je považován za 100 %, byla viabilita srovnatelná. Pro koncentraci HAP 730 µg/ml byla hodnota ($91,4 \pm 2,1$) %, pro 365 µg/ml to bylo ($106,9 \pm 3,9$) % a pro koncentraci 182 µg/ml byl hodnota viability ($104,6 \pm 7,9$) %. Dle normy EN ISO 10993-5:2009 jsou materiály s viabilitou 80 % a vyšší bez cytotoxického efektu. Můžeme tedy říci, že nanočástice HAP z experimentu 6 neměly žádný cytotoxický efekt na buněčnou linii 3T3. U dvou nižších koncentrací dokonce došlo k mírnému zvýšení viability oproti standardu.



Obrázek 17. Srovnání viability buněk po vystavení různým koncentracím HAP. — značí viabilitu standardu.

3 ZÁVĚR

V této práci byla prozkoumána precipitační metoda, ve které vystupovaly jako výchozí reaktanty tetrahydrát dusičnanu vápenatého a hydrogenfosforečnan diamonný. Prověřovány byly vlivy základních reakčních faktorů na finální vlastnosti produktu. Pro 9 experimentů, viz 2.2, byly zvoleny 3 různé teploty a 3 různé hodnoty pH. Měření bylo prováděno hlavně na velikost vznikajících částic, jejich strukturu a morfologii, a také jejich čistotu a molární poměr vápníku k fosforu, z důvodu snahy o dosažení vhodného poměru, v našem případě 1,67.

Pro zjištění chemického složení a čistoty produktu byly vzorky podrobeny analýze na energiově-disperzní spektrometrii a na Ramanově spektrometrii. Všechny vzorky vykazovaly přítomnost hydroxyapatitu a vysokou čistotu, co se týče nečistot ve formě sekundárních fází. Molární poměry Ca/P se pohybovaly v rozmezí od 1,63 do 2,03, tedy odchylka od vhodného poměru nebyla příliš velká, ale přesného poměru se dosáhnout nepodařilo. I když byly reaktanty míchány v přesném poměru, na základě dosažených výsledků se zdá, může, že na nárůst nebo pokles hodnoty molárního poměru může mít vliv teplota reakce. Při nejvyšší teplotě, tedy 80°C, bylo totiž dosaženo nejvyššího poměru Ca/P a při nižších teplotách, kde jejich rozdíl nebyl tak velký, byl poměr relativně nižší. Společně s EDS analýzou byly vzorky snímány na SEM. To bylo provedeno z důvodu zjištění velikosti částic, ale hlavně pro ověření struktury částic. U všech experimentů byly v produktu pozorovány částice podlouhlé, při vyšších reakčních teplotách, až jehličkové, které byly vytvořeny při nejnižší reakční teplotě (37°C). Jak již bylo zmíněno v 2.3.2.2, velikost částic nebylo možné u většiny vzorku změřit, ovšem ze snímků lze konstatovat, že se při teplotách 37°C a 80°C s rostoucím pH částice zmenšovaly, to bylo právě u 80°C ověřeno také měřením, kdy byla velikost částic při pH 9 přibližně 580×90 nm a při pH 10 už to bylo 270×70 nm. Při teplotě 50°C částice s rostoucím pH spíše narůstaly, nemůžeme tedy prokázat úplnou závislost velikosti částic na teplotě. Analýza pomocí dynamického rozptylu světla byla provedena pouze pro experimentu číslo 6, z důvodu zjištění okamžité tvorby klastrů a zkreslování výsledků měření. Pro časový vývoj nebyl jednoznačně prokázán vývoj velikosti částic nebo klastrů, ovšem rozdíl mezi prvním a posledním odběrem byl, i když minimální, prokázán, viz Tab. 4. U stejného experimentu byla také analyzována biokompatibilita, která je velmi důležitou vlastností syntetizovaného hydroxyapatitu. Z těchto testů vyšel hydroxyapatit

připravený precipitační metodou za teploty 50°C a pH 10 jako zcela kompatibilní a bez cytotoxického efektu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Vodičková, Věra. Elektronová mikroskopie I [online]. PDF. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/157/mod_resource/content/3/MNI_2_elmi%20I.pdf
- [2] Vodičková, Věra. Vybrané Metody Spektrální Analýzy [online]. PDF. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3550/mod_resource/content/1/MNI_8_SpektroII_N.pdf
- [3] Mestek, Oto. Stanovení Prvků Pomocí Přenosného Rentgenově Fluorescenčního Analyzátoru [online]. PDF. Praha: Ústav Analytické Chemie - VŠCHT, 2010. Dostupné z: http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_XRF_2010.pdf
- [4] Michal Kalina. *Využití disperzního analyzátoru Zetasizer Nano ZS pro charakterizaci disperzních soustav* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Poslední změna: 07.05.2012. [cit. 2016-06-24]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-disperzniho-analyzatoru-zetasizer-nano-zs-pro-charakterizaci-disperznich-soustav>
- [5] Lidmila Bartovská a kol. *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Redakce: Eva Dibuszová, ©2005. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/zimmuv_diagram.html
- [6] Wikipedia contributors. *Stokes shift* [online]. Wikipedia. The Free Encyclopedia. Poslední změna: 18.04.2016. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Stokes_shift&oldid=699253619
- [7] SADAT-SHOJAI, Mehdi, Mohammad-Taghi KHORASANI, Ehsan DINPANA-H-KHOSHDARGI a Ahmad JAMSHIDI. *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta Biomaterialia* [online]. 2013, 9(8), 7591-7621. ISSN 17427061. [cit. 2016-04-26] Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [8] Ulrich, Frederico. "Hydroxyapatite: Properties, Uses and Applications." *Hydroxyapatite: Properties, Uses and Applications*. Fluidinova, 2015. [cit. 26-04-2016]. Dostupné z: <http://fluidinova.com/hydroxyapatite-properties-uses-and-applications>
- [9] ZHOU, Hongjian a Jaebeom LEE. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, 7(7), 2769-2781. ISSN 17427061. [cit. 2016-04-26] Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.019.
- [10] BROWN, Paul W. a Brent. CONSTANTZ. *Hydroxyapatite and related materials*. Boca Raton: CRC, c1994. ISBN 0849347505.

- [11] MUCALO, Michael. *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*. Boston: Elsevier/Woodhead Publishing, Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2015. Woodhead Publishing series in biomaterials, no. 95. ISBN 1782420339.
- [12] SAERI, M.R., A. AFSHAR, M. GHORBANI, N. EHSANI a C.C. SORRELL. *The wet precipitation process of hydroxyapatite*. *Materials Letters* [online]. 2003, 57(24-25), 4064-4069. [cit. 2016-04-26]. ISSN 0167577x. Dostupné z: doi: 10.1016/S0167-577X(03)00266-0.
- [13] YUBAO, Li, K. DE GROOT, J. DE WIJN, C. P. A. T. KLEIN a S. V. D. MEER. *Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1994, 5(6-7), 326-331. [cit. 2016-04-26]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi: 10.1007/BF00058956.
- [14] SANTOS, Maria Helena and MANSUR, Herman Sander. *Low-cost processing technology for the synthesis of calcium phosphates/collagen biocomposites for potential bone tissue engineering applications*. *Mat. Res.* [online]. 2007, vol.10, n.4. [cit. 2016-04-26]. ISSN 1516-1439. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392007000400018
- [15] MOSTAFA, Nasser Y. *Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes*. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2005, 94(2-3), 333-341. [cit. 2016-04-26]. ISSN 02540584. Dostupné z: doi: 10.1016/j.matchemphys.2005.05.011.
- [16] Guzman V, C., Pina B, C., & Munguia, N. (2005). *Stoichiometric hydroxyapatite obtained by precipitation and sol gel processes*. *Revista Mexicana de Fisica*, 51(3), 284-293. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmf/v51n3/v51n3a10.pdf>
- [17] MOBASHERPOUR, I., M. Soulati HESHAJIN, A. KAZEMZADEH a M. ZAKERI. *Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method*. *Journal of Alloys and Compounds* [online]. 2007, 430(1-2), 330-333. [cit. 2016-04-26]. ISSN 09258388. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jallcom.2006.05.018.
- [18] PAZ, Adrian et al. *A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes*. *Quím. Nova* [online]. 2012, vol.35, n.9, pp.1724-1727. [cit. 2016-05-05]. ISSN 0100-4042. Dostupné z:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900004&lng=en&nrm=iso.

[19] LabGuide. *Fluorochromy* [online]. Lab Guide ©2014. Dostupné z: <http://labguide.cz/fluorochromy/>

[20] Yoruç, A, & Koca, Y. 'DOUBLE STEP STIRRING: A NOVEL METHOD FOR PRECIPITATION OF NANO-SIZED HYDROXYAPATITE POWDER'. Digest Journal Of Nanomaterials & Biostructures (DJNB). 2009, 4, 1, pp. 73-81. [cit. 2016-04.24]. Dostupné z: <http://www.chalcogen.ro/1Hazar-Yoruc.pdf>

[21] MONMATURAPOJ, Naruporn. *Nano-size hydroxyapatite powders preparation by wet-chemical precipitation route*. Journal of Metals, Materials and Minerals, 2008, 18.1: 15-20. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www.material.chula.ac.th/Journal/v18-1/15-20%20MONMATURAPOJ.pdf>

[22] ANGELESCU N., UNGUREANU D.N., ANGHELINA F.V.. *Synthesis and characcterization of hydroxyapatite obtained in different experimental conditions*. The scientific Bulletin of VALAHIA University – MATERIALS and MECHANICS [online]. 2011, 9(6), 15-18. [cit. 2016-04-26] Dostupné z: http://fsim.valahia.ro/sbmm.html/docs/2011/materials/3_Angelescu_2011.pdf.

[23] CASTRO, Filipa, António FERREIRA, Fernando ROCHA, António VICENTE a José ANTÓNIO TEIXEIRA. *Characterization of intermediate stages in the precipitation of hydroxyapatite at 37°C*. Chemical Engineering Science [online]. 2012, 77, 150-156. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ces.2012.01.058. ISSN 00092509.

[24] A. Chandrasekar, S. Sagadevan, A. Dakshnamoorthy. *Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique*. Int. J. Phys. Sci., 8 (32) (2013), pp. 1639–1645. [cit. 2016.04.26]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5897/IJPS2013.3990>

[25] Zyman ZZ, Rokhmistrov DV, Loza KI. *Determination of the Ca/P ratio in calcium phosphates during the precipitation of hydroxyapatite using X-ray diffractometry*. Process and Appl Ceramics 7: 2013, 93-95. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/0.2298/PAC1302093Z/>.

[26] MURALITHRAN, G a S RAMESH. *The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite*. Ceramics International [online]. 2000, 26(2), 221-230 [cit. 2016-05-03]. ISSN 02728842. Dostupné z: doi: 10.1016/S0272-8842(99)00046-2.

- [27] SADAT-SHOJAI, Mehdi, Mohammad-Taghi KHORASANI, Ehsan DINPANAHI-KHOSHDARGI a Ahmad JAMSHIDI. *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(8), 7591-7621 [cit. 2016-05-05]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [28] Wikipedia contributors. *Apatite*. [online]. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Poslední změna: 27.04.2016. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Apatite>
- [29] Park, Joon Bu. "Chapter 9 - Hydroxyapatite." *Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications*. New York, NY: Springer, 2008. 177-97. Print. Dostupné z: <https://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/105/public/9.1.-9.2.%20hydroxyapatit.pdf>
- [30] ZHOU, Hongjian a Jaebeom LEE. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, **7**(7), 2769-2781 [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.019. ISSN 17427061.
- [31] AZoM.com. *Hydroxyapatite – properties and applications*. In: www.azom.com [online]. 23.02.2001. 13.06.2013. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=107>
- [32] EDITORS, Valeri S. Gshalaev and Aleksandra C. Demirchan. *Hydroxyapatite synthesis, properties, and applications*. Hauppauge, N.Y: Nova Science Publishers, 2012. ISBN 9781620819487. Dostupné z: https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=41625
- [33] MÍČKOVÁ, Kateřina. Příprava a charakterizace nanokrystalických fosforečnanů [online]. Brno, 2013 [cit. 2016-05-11]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jiří Pinkas Dostupné z: http://is.muni.cz/th/211738/prif_m/
- [34] MFF UK. *Dynamický rozptyl světla* [online]. Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek. Poslední změna: 08.02.2008. [cit. 2016-05-14]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>